

DNA VACCINE FOR CORONAVIRUS INFECTION DISEASE

Patent number: JP2000302692
Publication date: 2000-10-31
Inventor: MAEDA TAKESHI; MOCHIZUKI MASAMI
Applicant: KYORITSU SHOJI CO LTD
Classification:
- **international:** A61K39/215; A61P31/12; A61K48/00; C12N15/09
- **europen:**
Application number: JP19990114115 19990421
Priority number(s): JP19990114115 19990421

Report a data error here

Abstract of JP2000302692

PROBLEM TO BE SOLVED: To obtain a DNA vaccine against coronavirus infection diseases effective for improving the prevention of crisis and the therapeutic effect after crisis by including a specific expression vector and physiological saline solution. **SOLUTION:** The objective DNA vaccine contains physiological saline solution and an expression vector containing a DNA coding for nucleocapsid protein of feline infective peritonitis virus, capable of expressing the protein in an applied animal, having the DNA sequence of the formula or a DNA sequence having a homology of $\geq 95\%$ with the DNA sequence of the formula and coding for a nucleocapsid protein capable of imparting immunity to the applied animal. The amount of the expression vector to be added to the vaccine is 100-300 $\mu\text{g/mL}$ and the administration rate of the vaccine by single inoculation is preferably 100-300 $\mu\text{g}/\text{head}$.

Data supplied from the esp@cenet database - Worldwide

BEST AVAILABLE COPY

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開2000-302692

(P2000-302692A)

(43)公開日 平成12年10月31日 (2000.10.31)

(51)Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テ-マコ-ト ⁸ (参考)
A 6 1 K 39/215		A 6 1 K 39/215	4 B 0 2 4
A 6 1 P 31/12		31/00	6 3 1 J 4 C 0 8 4
A 6 1 K 48/00		48/00	4 C 0 8 5
C 1 2 N 15/09	Z NA	C 1 2 N 15/00	Z NAA

審査請求 未請求 請求項の数3 OL (全29頁)

(21)出願番号 特願平11-114115

(22)出願日 平成11年4月21日 (1999.4.21)

(71)出願人 591047970

共立商事株式会社

東京都千代田区九段南1丁目5番10号

(72)発明者 前田 健

山口県山口市湯田温泉6-8-29 山口大学湯田宿舎706

(72)発明者 望月 雅美

神奈川県横浜市青葉区大場町698番地32

(74)代理人 100073874

弁理士 萩野 平 (外4名)

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 コロナウイルス感染症に対するDNAワクチン

(57)【要約】

【課題】 今まで実質的に有効なワクチンがなく、防御が困難であったF I P V等のコロナウイルス感染症に対する有効な予防/治療手段を開発することであり、特に、防御が困難であったF I P Vの予防、発症の防御、及び治療ができるDNAワクチン提供すること。

【解決手段】 ネコ伝染性腹膜炎ウイルスにおけるヌクレオカプシドタンパク質をコードするDNAを含む発現ベクターと生理食塩水とを含むコロナウイルス感染症に対するDNAワクチン。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 ネコ伝染性腹膜炎ウイルスにおけるヌクレオカプシドタンパク質をコードするDNAを含み、該タンパク質を適用動物内で発現させることができる発現ベクターと、生理食塩水とを含むことを特徴とするコロナウイルス感染症に対するDNAワクチン。

【請求項2】 ネコ伝染性腹膜炎ウイルスにおけるヌクレオカプシドタンパク質をコードするDNAが、配列表の配列番号1に記載のDNA配列を有するか、あるいは配列表の配列番号1に記載のDNA配列との相同性が95%以上であり、適用動物に対して免疫を付与できるヌクレオカプシドタンパク質をコードするDNA配列を有することを特徴とする請求項1に記載のコロナウイルス感染症に対するDNAワクチン。

【請求項3】 ネコ伝染性腹膜炎ウイルスにおけるヌクレオカプシドタンパク質をコードするDNAが、配列表の配列番号1に記載のDNA配列を有することを特徴とする請求項1に記載のコロナウイルス感染症に対するDNAワクチン。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】 本発明は、ネコ伝染性腹膜炎 (Feline infectious peritonitis; FIP) を引き起こすウイルス (FIPV) 等のコロナウイルス感染症に対する予防／治療に有効なDNAワクチンに関するものである。

【0002】

【従来の技術】 猫には、猫伝染性腹膜炎 (Feline infectious peritonitis; 以下、「FIP」という) という病気がある。FIPは、コロナウイルス科コロナウイルス属に属するネコ伝染性腹膜炎ウイルス (FIPV) によって引き起こされるネコの致死性疾患である。FIPは6ヶ月齢から5歳までのネコあるいは純血種のネコで起こりやすいことが知られている (Scott, 1991, Pedersen et al., 1983)。罹患ネコの口腔及び気道の分泌物、糞便並びに尿などからウイルスが排出され、経口感染すると考えられている。経口的に感染したウイルスは、咽頭や腸管上皮で増殖し、粘膜のバリヤーを通過後、血中のマクロファージに感染して全身に広がる (Hayashi et al. 1983; Scott, 1989)。FIPを発症したネコは、最初は発熱、食欲不振、不活発、体重減少、嘔吐、下痢、脱水、貧血のような非特異的かつ非限局性の症状を呈する。症状が進行するにつれて滲出型 (wet type) と非滲出型 (dry type)、あるいはそれらの混合型のFIPに典型的な症状を呈するようになる。

【0003】 滲出型は、腹腔、胸腔に浸出液が貯留し、通常無痛性の腹部の膨満が確認できる。浸出液が胸腔に著しく貯留した場合は呼吸困難を伴う。一方、非滲出型

は、肝臓、腎臓、脾臓などの腹部臓器、眼、中枢神経系及び肺のような様々な器官に化膿性肉芽腫性炎と壞死性血管炎を呈することを特徴とする。一般に滲出型FIPの場合は臨床経過が急性であるのに対して、非滲出型FIPにおいては慢性あるいは潜行性の経過をとりはっきりしないことがある。しかし、いずれの場合も臨床症状が発現した場合、ほとんど進行性かつ致死性である。

【0004】 FIPVは大きさが約100~150nmであり、エンペロープを有しその内側には螺旋状のヌクレオカプシド構造を持っている。その主要な構造蛋白としては、エンペロープから突出した糖蛋白 (スパイク (S) 蛋白)、膜蛋白であるM蛋白、ヌクレオカプシド蛋白であるN蛋白などが挙げられる。それ以外にもFIPVウイルスゲノム上にはORF1a, 1b (RNAPolymerase)、ORF3a, 3b, 3c, 3d, small membrane蛋白、ORF7a, 7bなどの遺伝子が存在する。しかし、FIPV感染細胞の抽出液をFIPV感染ネコ血清を用いてimmunoblot解析を行うと、S蛋白 (分子量180~205kDa)、M蛋白 (分子量25~30kDa)、N蛋白 (分子量43~50kDa) の3種類が検出される。そのため、これら3種類が免疫系による主要な標的となっていると考られている。

【0005】 FIPV感染の特徴として、抗体依存性感染増強 (Antibody-dependent enhancement; ADE) が挙げられる (Cora Piet al., 1992; Houdatsu et al., 1991; Olsen et al., 1992)。ADEとは本来、異物を排除するための生体の防御機構である抗体が、逆にFIPVのマクロファージへの感染を促進させ、症状を悪化させることである。このため従来の抗体を誘導する不活化ワクチンや弱毒生ワクチンなどでは、逆に症状を悪化させることが知られている。このADE作用のため、致死性であるにも関わらずFIPに対する有効なワクチンは未だ開発されていない。現在、FIPワクチンとして唯一存在するのは、弱毒化生ウイルスの温度感受性株を用いた鼻腔内ワクチン (Primucell FIP; Smith Kline Beecham) である。このワクチンは、温度感受性なので鼻咽頭では増殖するが、全身的な増殖がなく、鼻及び腸の局所粘膜免疫、唾液免疫グロブリンA (IgA) 及び細胞免疫を促進する。さらに、FIPVの多くの株を交差防御するという特徴を持つ。

【0006】 鼻腔内ワクチンを用いた各種の治験においてワクチン接種後6ヶ月若しくはそれ以前に感染攻撃した場合、生存率は接種群が71~85%である。ワクチン非接種群の生存率は17~20%である。鼻腔内ワクチンの効果は、ウイルス株とウイルス感染量によって異なることが報告されている (Scott, et al., 1992)。ウイルスの暴露量が少量であれば、

50%のネコをFIPVから防御できるが、大量（10⁵ TCID₅₀以上）の暴露ではほとんど防御できず、却ってFIPの感染増強すら見られた。また、他のデータでも野外のネコでワクチン接種群と非接種群のFIP発症と死亡率の有意差を示すことが出来なかつたことが報告されている（Fanton, 1991）。また、生ワクチンの欠点である病原性復帰の可能性なども考えられる。結局、未だ有効なワクチンはないと言える。

【0007】

【発明が解決しようとする課題】従つて、本発明の目的は、致死性でありながら今まで実質的に有効なワクチンがなく、防御が困難であったFIPV等のコロナウイルスに対する有効な予防手段を開発することであり、具体的には、防御が困難であったFIPV等のコロナウイルス感染症の予防、発症の防御、及び発症後の治療ができるDNAワクチンを提供することである。

【0008】

【課題を解決するための手段】本発明者等は、上記諸特性に留意し銳意検討した結果、本発明の目的が以下の構成によって達成されることを見出し、本発明に到達した。即ち、本発明は、下記構成である。

(1) ネコ伝染性腹膜炎ウイルスにおけるヌクレオカプシドタンパク質をコードするDNAを含み、該タンパク質を適用動物内で発現させることができる発現ベクターと、生理食塩水とを含むことを特徴とするコロナウイルス感染症に対するDNAワクチン。

(2) ネコ伝染性腹膜炎ウイルスにおけるヌクレオカプシドタンパク質をコードするDNAが、配列表の配列番号1に記載のDNA配列を有するか、あるいは配列表の配列番号1に記載のDNA配列との相同性が95%以上であり、適用動物に対して免疫を付与できるヌクレオカプシドタンパク質をコードするDNA配列を有することを特徴とする前記(1)に記載のコロナウイルス感染症に対するDNAワクチン。

(3) ネコ伝染性腹膜炎ウイルスにおけるヌクレオカプシドタンパク質をコードするDNAが、配列表の配列番号1に記載のDNA配列を有することを特徴とする前記(1)に記載のコロナウイルス感染症に対するDNAワクチン。

【0009】特開平3-164182号公報には、FIPVの79-1146株のM-タンパク質又はN-タンパク質をコードするヌクレオチド配列が開示され、そのM-タンパク質又はN-タンパク質のいずれもワクチンとして使用できることが示唆されている。しかしながら、該公報には、実質的には上記株のM-タンパク質又はN-タンパク質をコードするヌクレオチド配列のみが開示され、該タンパク質のワクチンとしての実際の効果は示されていない。H. Vennema, et al., *Virology*, 181, 327-335には、FIPVの79-1146株のM-タンパク質又はN-タンパク質をコードする遺伝子をワク

シニアウイルスに組み込んだ組み換えワクシニアウイルスワクチンを作成し、ワクチンとしての効果を検討している。この文献によると、M-タンパク質の遺伝子を組み込んだ組み換えワクチンでは、強毒株の攻撃に対してある程度効果があり、N-タンパク質の遺伝子を組み込んだ組み換えワクチンではその効果がないと記載されている。

【0010】本発明においては、FIPVにおいて免疫を付与できるタンパク質を種々検討した結果、そのタンパク質のうちN-タンパク質に着目し、それをDNAワクチンという特有の構成とすることにより、従来感染予防が困難であったFIPを防御できるワクチンの開発に成功した。後述するように、上記文献で効果があると記載されたM-タンパク質では、意外なことに、DNAワクチンとしては効果がなく、逆にADE様活性を誘発した。

【0011】本発明のDNAワクチンは、FIPV感染症の予防/治療に最も有効であるが、このコロナウイルス感染症以外にも、豚伝染性胃腸炎ウイルス感染症、豚流行性下痢ウイルス感染症、イヌコロナウイルス感染症、ネコ腸内コロナウイルス感染症等のコロナウイルス感染症にも、これらの原因ウイルスが抗原的に非常に近似しているので有効である。本発明のDNAワクチンは、ネコ、イヌ、ヒト、ブタ等のコロナウイルスが感染する哺乳動物に適用できるが、中でもネコに有効である。本発明におけるDNAワクチンは、感染症が発症している場合でも該DNAワクチンを投与することで下記の如く宿主免疫系、特に細胞性免疫を誘導することで病気の回復が期待できることから治療にも有効である。

【0012】尚、DNAワクチン、すなわちDNA接種によってDNAは細胞内に取り込まれ、コードする蛋白（抗原）が細胞内で合成されるというワクチンは、1990年代になって報告がなされた（Hasset and Whitten, 1996; Ulmer et al., 1993, 1996; John et al., 1997）。プラスミドDNAから発現される蛋白は抗原プロセッシングを受けた後、MHC class I及びMHC class II拘束性抗原提示により細胞性免疫、液性免疫両方を誘導できることが報告されている（Clemik et al., 1996; Tang et al., 1992）。また、DNAワクチンは、従来の生ワクチン、不活化ワクチンと比較して生物学的に安全であると考えられており、感染症に対する新たなワクチン法として期待されているものである。

【0013】

【発明の実施の形態】以下、発明の実施の形態を説明するが、本発明はこれに限定されない。本発明において、FIPVにおけるヌクレオカプシドタンパク質（N-タンパク質ともいう）をコードする遺伝子（DNA）としては、従来のFIPVの各種の株から分離、クローニン

グでき、そのN-タンパク質によりネコにおいてはFIPVとネコ腸内コロナウイルス、豚においては豚伝染性胃腸炎ウイルスと豚流行性下痢ウイルス、イヌにおいてはイヌコロナウイルスに対する免疫を付与できるものが使用できる。N-タンパク質をコードする遺伝子は例えば以下の方法でクローニングすることができる。従来の方法で増殖させたFIPVからRNAを抽出し、そのRNAから逆転写酵素によりcDNAを作成し、そのcDNAを録型として所定のプライマー（例えば、FIPV NF、FIPV NR等）を用いてPCR法（詳しくはRT-PCR法）により該遺伝子を增幅し、これを所定のクローニングベクターに組み入れてクローニングすることができる。

【0014】本発明においては、N-タンパク質をコードする遺伝子は、配列表の配列番号1に記載のDNA配列を有するか、あるいは配列表の配列番号1に記載のDNA配列との相同性が95%以上であり、ネコ、イヌ、豚に対して免疫を付与できるヌクレオカプシドタンパク質をコードするDNA配列を有するものであることが好ましい。より好ましくは配列表の配列番号1に記載のDNA配列である。

【0015】発現ベクターとしては、上記遺伝子が当該動物体内で発現できるように、上記N-タンパク質をコードするDNAを挿入できる部位と、その上流にプロモーターやSD配列を有するものが使用できる。また、宿主でその発現ベクターが増殖できないものがよく、例えば、複製開始点（ori）として原核細胞由来のものを使用することで達成される。発現ベクターの具体例としては、プラスミドpME18S、pCAGGS等の真核細胞での発現プロモーターを有するプラスミドが挙げられる。

【0016】上記遺伝子を有する発現ベクターの作成法としては、上記クローニングしたN-タンパク質をコードする遺伝子と、発現ベクターを各々制限酵素で切断し、各々末端修飾したのち、DNAリガーゼで両者を結合させて、N-タンパク質をコードする遺伝子が導入された発現ベクターを得ることができる。上記N-タンパク質をコードする遺伝子が導入された発現ベクターは、生理食塩水中に添加されてワクチンとして使用する。そのベクターのワクチン中の添加量としては目安として100μg/m1～300μg/m1が挙げられる。また、添加剤としては、アジュバント、サイトカイン、サイトカイン発現プラスミド等が挙げられるが、副作用を考えると、無添加が好ましい。

【0017】本発明のDNAワクチンの投与方法としては、注射等の手段を用いて各種組織、例えば筋肉組織に接種できる。また、上記発現ベクターを表面に覆った金粒子を生理食塩水に溶解したものを接種することもできる。これにより、上記発現ベクターを取り込む細胞が非選択的となる。また、接種回数としては、目安として1

回～3回接種でき、その各接種間の間隔としては、1週間～3週間を挙げることができる。1回の接種での投与量としては100μg/1頭～300μg/1頭が挙げられる。

【0018】

【実施例】以下、本発明を実施例により更に詳細に説明するが、本発明の内容がこれにより限定されるものではない。

〈ワクチンの製造〉FIPV M91-267株のN遺伝子とM遺伝子をクローニングし、プラスミドDNAとインサートDNAのライゲーション反応物を作成した。

1. 遺伝子クローニング

実験には、ネコ由来培養細胞であるfeline macrophage-like Feline catus whole fetus (fcwf-4) 細胞を用いた。fcwf-4細胞は、Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) (シグマ、ケミカル) に、10% (v/v) 非動化牛胎児血清 (FCS) と抗生物質 (100U/mlペニシリン、100U/mlストレプトマイシン) を加えたものを増殖培地として、5%炭酸ガス培養器中で培養した。

【0019】fcwf-4細胞にウイルス液を接種し、37°Cで60分間、15分毎に優しく混和しながらインキュベートすることにより細胞へウイルスを吸着した。ウイルスは、強毒FIPVであるM91-267株を用いた [Mochizuki et al., J. Vet. Med. Sci., 59 (4); 253～258 (1997)]。その後、ウイルス液を吸引し、DMEMでfcwf-4細胞を2回洗浄後、FCS非添加のDMEMで維持した。細胞変性効果 (CPE) が細胞全体に見られたときに上清を回収し、-80°Cでしばらく保存した。

【0020】(感染価の測定) 使用するウイルス液は、以下の方法で感染価の測定を行った。ブラーク assayを行ってウイルス感染価を求めた。簡単に述べると、fcwf-4細胞を直径35mmシャーレで90% confluent になるまで増殖させ、DMEMで10倍階段希釈したウイルス液を200μlずつ接種し、60分間15分毎にやさしく混和しながら37°Cでインキュベートした。DMEMで2回細胞を洗浄し、2%FCSと1%アガロース添加のDMEMを1シャーレ当たり2mlずつ重層した。2日間37°CのCO₂インキュベーターで培養し、ホルマリン固定後、0.05%クリスタルバイオレットで染色し、ブラーク数を数え、plaque-forming unit (PFU) 値を算出した。

【0021】FIPV M91-267株のN遺伝子とM遺伝子をクローニングするため、該ウイルス株を35mmシャーレに感染後、CPEが全面に広がったところ

で細胞を回収し、RNeasy Mini Kit (QIAGEN社製) によりRNAを抽出した。得られた1 μ gのRNAをAMV由来Reverse-transcriptaseにより逆転写して、cDNAを作製した。このcDNAを録型として5'-ggatccatggccacacaggacaa-3' (FIPVN F) と5'-ggatccttagttcgtaacctcatc-3' (FIPVNR) を用いて、LA Taq polymeraseによりPCR (92°C 1'、45°C 1'、72°C 2'、35cycles) を行ってN蛋白遺伝子を増幅した。

【0022】同様に、5'-ggatccatgcattatgatgcctata-3' (FIPVMF) と5'-ggatccttacaccatatgtaataa-3' (FIPVMR) を用いて、LA Taq polymeraseによりPCR (92°C 1'、45°C 1'、72°C 2'；35cycles) を行ってM蛋白遺伝子を増幅した。

【0023】これらの反応産物をフェノール／クロロホルムで抽出し、エタノール中で沈殿させて精製し、その後、PCR産物のdirectクローニング用のベクターpUC118TA (制限酵素XcmI 切断部位を2つ有する) に組み込んで、以下の実験に用いた。

【0024】2. DNAワクチン用発現プラスミドの作成

①インサートフラグメントの調製

FIPVのN蛋白をコードする遺伝子を含むプラスミドpUC118TA-NをBamHIで切断し、FIPV N遺伝子を含む1.2kb断片をGene Clean II (BIO-101社) により回収した。切断して得られた断片をKlenow 酵素により平滑末端にし、フェノール／クロロホルムで抽出した。その後、その抽出物をエタノールで沈殿し、沈殿物を80%エタノールで洗浄し、乾燥後、適量の滅菌水で溶解した。

【0025】同様に、FIPVのM蛋白をコードする遺伝子を含むプラスミドpUC118TA-MをBamHIで切断し、FIPV-M遺伝子を含む0.9kbをGene Clean II (BIO-101社) により回収した。これをKlenow酵素により平滑末端にし、フェノール／クロロホルム抽出し、その後、その抽出物をエタノール沈殿し、沈殿物を80%エタノールで洗浄、乾燥後、適量の滅菌水で溶解した。

【0026】②ベクターの調製

ここではFIPV N遺伝子の予防・治療への有効性を実証するために、一つの例として、Simian Virus 40のoriと、サイトメガロウイルスのエンハンサーと、鶏ベーターアクチンプロモーターと、ウサギベーターグロブリン3' フランギング配列とを、pUC13に組み込んだプラスミドpCAGGS (Niwa et al., 1991) を用いてみた。本プラスミドを

EcoRIで切断し、Gene Clean II (BIO-101社) を使用して回収した。切断したプラスミドpCAGGSを、Klenow酵素により平滑末端にし、フェノール／クロロホルム抽出した。その後、エタノール沈殿し、沈殿物を80%エタノールで洗浄し、乾燥後、適量の滅菌水で溶解した。これをCIAP (Calf intestinal alkaline phosphatase) で処理し、その後、フェノール／クロロホルム処理、エタノール沈殿処理を行い、その後、80%エタノールで洗浄し、次いで乾燥した後、適量の滅菌水に溶解した。

【0027】③プラスミドDNAのライゲーション反応 上記で調製したプラスミドDNAとインサートDNAを1:3-5のモル比で混ぜ、10~20 μ lとなるように等量のDNA Ligation Kit Version 2 Solution I (宝酒造製) を加え、混和後16°Cで12~15時間反応させることにより、N/pCAGGSとM/pCAGGSとを構築した。構築したN/pCAGGSとM/pCAGGSとは、制限酵素で切断されることで目的のプラスミドであることを確認した(図3、図9)。

【0028】強制感染実験〈動物実験〉

13週齢のSPF猫(雄)を購入し、N/pCAGGS接種群、M/pCAGGS接種群、pCAGGS接種群(コントロール群)の3群に配分し、滅菌水と市販の餌で飼育した。QIAGENメガキット (QIAGEN社製) を用い、大量精製したDNAを猫1頭あたり200 μ g右後肢の大腿二頭筋に筋肉接種し、2週間隔で3回接種した。その最終接種から2週間後に、1頭あたり1 \times 10⁶ PFUのFIPVM91-267株を腹腔内接種した。

【0029】ウイルス接種前には週1回、接種後には週2回頸静脈から採血し、MICROCELL COUNTER F-800 (Sysmex) により赤血球数、白血球数、ヘモグロビン値、ヘマトクリット値を測定し、FUJI DRI-CHEM 5500S (富士メディカルシステム株式会社) により血中の尿素窒素 (BUN) 、クレアチニン (CRE) 、アラニンアミノ転移酵素 (GPT) 、アスパラートアミノ転移酵素 (GOT) を測定した。また、塗末標本より白血球百分比(分葉好中球、桿状好中球、リンパ球好酸球、单球)を測定した。別に分注した血液を、室温、15000 rpm、15分間遠心して血漿を回収し、56°C、30分で非効化後、中和抗体価の測定とウエスタンブロット (Western blotting) 解析を行った。

【0030】また、ウイルス攻撃前には、週1回、攻撃後は毎日、体温、体重、摂食量を測定し、便の状態、沈鬱、神経症状を観察した(下記表2~9)。臨床症状は、表1に示した基準に従って、スコアリングを行った。実験ネコは瀕死の状態になったとき、致死量のケタ

ミン投与と心採血により安樂死させ、剖検を行った。上記結果を下記表-2~9と、図4~8、図10~14に示す。

【0031】〈ウエスタンプロット解析〉調製した抗原をサンプルバッファー (6. 25 mM Tris-HCl、2. 0% SDS、5. 0% メルカプトエタノール、20% グリセロール、0. 001% プロモフェノールブルー) と混和し、100°Cで2分加熱し、12% SDS-PAGEゲル (Laemmli et al., 1970) で泳動した。ポリビニリデンジフルオライド (Poly vinylidene difluoride) (Millipore社製) 膜をあらかじめ100%エタノールと転写バッファー (25 mM Tris、192 mM グリシン、20% メタノール) に浸しておき、陽極側から、3 MMペーパー、膜、アクリルアミドゲル、3 MMペーパーの順に並べ、10Vで1時間転写した (Towbin et al., 1979)。

【0032】その後、3%ゼラチン (EIA grade, Bio Rad) 添加TBS (0. 5M NaCl、0. 02M Tris [pH 7. 5]) でブロッキング後、TTBS (0. 05% Tween-TBS) で三回洗浄した。次に、10倍希釈になるようにネコ血漿を加えた1%ゼラチンTTBSを加え、37°C 1時間反応させ、その後TTBSで三回洗浄した。二次抗体としてペルオキシダーゼ標識山羊抗ネコIgGを500倍希釈したものをもちいて、37°C 30分反応させた。TTBS、TBSでそれぞれ三回洗浄した後、ジアミノベンジン四酸塩錠 (和光) を1錠 (10 mg) とH₂O₂を3 μlのTBSに加え、室温で反応させた。

【0033】〈ウイルス中和試験〉

被検血漿をD MEMで2倍段階希釈し、50 μlずつ96穴プレートに入れ、50 μlのFIPV M91-267株 (1穴当たり100 PFU) を加えた。37°Cで60分反応させた後、24穴プレートで90% confluence になるまで増殖させた f c w f-4細胞に加え、15分毎に穏やかに混和しながら、37°C、1時間反応させた。その後は、感染価の測定と同様の操作を行い、ブラーク数を算定した。75%ブラークが減少する血漿の最高希釈倍率の逆数を中和抗体価とした。

【0034】〈塩基配列の決定〉

① シークエンス用クローンの作成

FIPVのN-タンパク質をコードする遺伝子を含むプラスミドpUC118TA-NをBgl I Iで切断し、0. 6 kbp、0. 5 kbpの二つの断片をGene Clean II (BIO-101社) により回収した。FIPVのN-タンパク質をコードする遺伝子は、Bgl I Iにより二カ所が切断されるため、0. 6 kbpと0. 5 kbpの中間部分の約20 bpのシークエンスを行うために、別にpUC118TA-NをPst Iで切断し、3. 9 kbpを切り出して、セルフラ

イゲーションした。同様にFIPVのM-タンパク質をコードする遺伝子を含むプラスミドpUC118TA-MをBgl I Iで切断し、0. 5 kbp、0. 4 kbpの二つの断片をGene Clean II (BIO-101社) により回収した。ベクターに、pBlue script SK (+) を用い、これをBamHIで切断し、フェノール/クロロホルムで抽出した後、エタノールで沈殿させ、得られた沈殿物を80%エタノールで洗浄し、乾燥後、適量の滅菌水に溶解し、アルカリフェオヌクターゼ (CIAP; Calf Intestine Alkaline Phosphatase) 処理後、Gene Clean II (BIO-101社) により回収した。調整したインサートDNAとベクターは、DNAワクチン用プラスミド作成時と同様の手技によりライゲーション反応を行い、シークエンス用クローンを構築した。

【0035】② サンプルの調整

サンプル調整は、DNA sequencing Kit Dye Primer Cycle Sequencing Ready Reaction (PERKIN-ELMER, Great Britain) を用いて行い、DNA塩基配列の決定は、ABI prism 377 auto sequencer (PERKIN-ELMER, Foster CA, U. S. A) を用いて行った。

【0036】〔実験例の結果〕

1. FIPV N遺伝子とM遺伝子のクローニングと塩基配列の決定

日本で望月ら (1997) によりFIP症状を呈して死亡したネコより分離され、腹腔内接種によりネコにFIPを引き起こすことが知られているM91-267株よりRNAを抽出後、RT-PCRによりN遺伝子とM遺伝子を增幅した結果、それぞれ1146 bpと882 bpが検出された。これをTAベクター (制限酵素Xcm I 切断pUC118TA) にクローニングし、塩基配列を決定した。N遺伝子は376アミノ酸残基をコードする1131塩基よりなっていた (配列表の配列番号1)。N遺伝子の構造遺伝子は1~1128番目である。また、M遺伝子は289アミノ酸残基をコードする870塩基よりなっていた (配列表の配列番号3)。M遺伝子の構造遺伝子は1~867番目である。

【0037】アミノ酸配列をすでに報告されているコロナウイルスのものと比較した結果、N蛋白においては79-1146株のものと93. 4%の最も高い相同性を有しており、犬コロナウイルス (CCV) とは76. 4%、豚伝染性胃腸炎ウイルス (TGEV) とは75. 9%の相同性を有していた。M蛋白においては79-1146株のものと90. 5%の最も高い相同性を有しており、犬コロナウイルス (CCV) とは84. 7%、豚伝染性胃腸炎ウイルス (TGEV) とは88. 6%、豚流

行性下痢ウイルス (PEDV) とは 52.3%、ヒトコロナウイルス (HCoV) の 229E 株とは 45.7%、ウシコロナウイルス (BCoV) とは 42.9%、七面鳥コロナウイルス (TCoV) とは 42.3%、ヒトコロナウイルス (HCoV) の OC43 株とは 39.8%、マウス肝炎ウイルスとは 39.3%、鶏伝染性気管支炎ウイルス (IBV) とは 27.4% の相同意を有していた。加えて、系統樹を作成した結果、従来の報告通りネココロナウイルス間では他の動物種由来のコロナウイルスよりも近縁であることが示された (図1、図2)。

【0038】2. 各検体の臨床症状と各測定結果
以下に、臨床症状のスコアリング基準、臨床症状と各測定結果を示した表-1～9を示す。尚、表-2は、M群の検体番号1の結果、表-3はM群の検体番号2の結果、表-4はコントロール群の検体番号3の結果、表-5はコントロール群の検体番号4の結果、表-6はコントロール群の検体番号5の結果、表-7はN群の検体番号6の結果、表-8はN群の検体番号7の結果、表-9はN群の検体番号8の結果を示す。

表-2 検体番号1 (M群)

PID	B.W.	FIPV cat																			
		B.T.	Ht	BUN	CPK	CRE	GOT	GPT	LDH	白血球	赤血球	Hb	分葉好中球	リンパ球	単球	好酸球	Starg	下痢	摂食量	沈降	神経症状
Ave		39.1	32.5							171	839.8	10.34	42.2	47.9667	2.3	7.23333	0.31887				
S.D.		0.25	2.87							54.27	87.4	0.458	6.633653	7.84179	0.98841	2.02163	0.28077				
Ave+2*SD(上限)		39.6	36.2	32	29.5	1.7	80	60	234	279.5	1075	11.25	55.48771	83.2503	4.27282	11.2758	0.8382				
Ave-2*SD(下限)		38.6	26.8	18	18	0.5	5	10		62.48	725	8.429	28.93229	32.6831	0.32718	3.19007	-0.2049				
(3種混合ワクチン)	-77	980	0.39	38.8	33					179	875	10.3									
	-70	1050	0.43	39	31					187	865	9.5									
	-63	1130	0.46	38.9	25					323	847	9.7									
(3種混合ワクチン)	-58	1350	0.55	39.2	31					179	1080	10.4									
	-49	1360	0.58	38.8	35					175	828	10.4									
(DNAワクチン)	-42	1530	0.62	39	36					159	888	10.8									
	-35	1800	0.73	39.5	34					160	851	10.9	49.6	35.7	3.8	10.5	0.4				
(DNAワクチン)	-28	1890	0.77	39.1	33					182	893	9.8	51.5	38.6	2.5	7	0.4				
(DNAワクチン)	-21	2020	0.82	39.2	35					151	824	10.2	45.1	48.4	1.8	4.9	0				
(DNAワクチン)	-14	2230	0.91	38.9	32					118	823	10.3	57.3	52.8	1.8	8.1	0.2				
	-7	2480	1.01	39.5	32					125	1037	10.9	37.4	51.1	3.5	7.4	0.7				

【0041】

【0039】

【表1】

症状	程度	臨床症状スコアリング	
		ポイント	
体重	10～19%減少	1	
	20～29%減少	2	
体温	40℃以上	1	
ヘマトクリット	25%以下	3	
白血球数	6000/μl以下	2	
分葉好中球	80%以上	1	
リンパ球	10%以下	1	
好酸球	1%以下	1	
単球	10%以上	1	
下痢		1	
食欲不振		1	
沈黙		1	
神経症状		1	
瀕死		25	

【0040】

【表2】

【表3】

表-2 (つづき) 検体番号1 (M群)

チャレンジ	PID	B.W.	B.T.	Ht	BUN	CPK	CRE	GOT	GPT	LDH	白血球	赤血球	Hb	分葉好中球	リンパ球	单球	好酸球	Starg	下痢	便量	飲食	FIPV cat		神経症状	
																						便	便		
0	2460	139.7	34	32.3	801	1.6	31	47	560	146	609	11.1	32.4	61.4	0.6	5.5	0.2						-	-	-
1	2420	0.98	39.8																				285	-	-
2	2530	1.03	39.8																				300	-	-
3	2580	1.05	40.1	32	27.7	442	1.3	50	63	437	112	743	10	87.3	20.7	0.5	2.4	1.7					160	-	-
4	2620	1.07	39.3																				200	-	-
5	2600	1.05	40.1																				130	-	-
6	2570	1.04	39.4																				130	-	-
7	2510	1.02	39.7	20	22.1	619	0.9	71	86	319	108	698	7	55.3	36.9	6.4	1.1	0.2	便なし				130	-	-
8	2440	0.89	39.1																				130	-	-
9	2480	1.01	38.9																				130	-	-
10	2390	0.97	40.0	16	16.7	314	0.9	85	131	289	42	474	5.2	81.7	5.4	1.8	0	1.3					80	-	-
11	2300	0.93	40.2																便なし				105	-	-
12	2310	0.94	40.1																				50	+	-
13	2280	0.93	40.4																				60	+	-
14	2190	0.89	40.6	17	19.4	391	1	95	82	588	65	457	5.1	77.5	17.8	3.9	0.4	0.4	便少し				85	+	-
15	2125	0.88	40.5																便なし				50	++	-
16	2090	0.86	40.1																便なし				0	+	-
17	2080	0.85	40.2																便少し				55	++	便詫ふらつき、痙攣、偶れてぐったり、足で空をかく
18	2055	0.84	40.0	18	19.6	298	0.8	133	100	509	24	247	8.3	89.3	7.7	1.8	0.7	0.5	便なし				30	+	-
19	2025	0.82	40.1																便なし				80	+	-
20	1990	0.81	40.0																便少し				50	+	-
21	1880	0.8	39.4	15	15.8	148	0.7	108	73	317	38	257	4.3	90.8	8.7	4.5	0.3	0.3	便なし				20	+	-
22	1895	0.81	39.8																便少し				+		-
23																			78.2	10	10	0	1.7		

マクロ所見 PID23未明死亡

脳下膜	出血斑、直径2-3mm	胸水	1-2ml	肺	左前葉の筋炎、出血斑、直径2-3mm、金属に散在
心膜	著なし	喉球	前庭房水黄色、粘膜度高い	大脳	頭頂に直径2mmの白色点の散在
小脳		脊髄	特になし	右大脳筋肉	著なし
脛膜	特になし	腸	カタル性腸炎	腸潤脹リンパ	頭大、直径5mm-2cm
腎臓	表面より隆起した直径3mmほどの白色結節			脛膜面黄色	肝臓

【0042】

【表4】

表-3 検体番号2 (M群)

PID	B.W.	B.T.	Ht	BUN	CPK	CRE	GOT	GPT	LDH	白血球	赤血球	Hb	分葉好中球	リンパ球	单球	好酸球	Starg	下痢	便量	飲食	FIPV cat		神経症状					
																					便	便						
Ave		38.7	34.2																					0.08				
S.D.		0.32	2.57																					46.28	170.3	2.25		
Ave+2SD(上限)		39.4	39.3	32	295	1.7	80	60	234	292.2	1228	16.12	57.95	114	43.42	74	2.82265	19.5621	0.31094									
Ave-2SD(下限)		38.1	29	18	18	0.6	5	10		107.1	545.2	7.117	48.41	552	26.9059	0.91068	0.07127	-0.1509										
(3種混合ワクチン)	-77	1080	0.88	38.1	31					112	1110	16.8																
	-70	1150	0.4	38.4	31					205	733	9.7																
	-63	1280	0.44	38.6	34					147	869	14.8																
(3種混合ワクチン)	-56	1470	0.52	38.7	34					287	794	11																
(DNAワクチン)	-49	1530	0.54	38.6	37					212	814	11.2																
(DNAワクチン)	-42	1750	0.62	38.3	39					237	1244	11.8																
	-35	2010	0.71	38.6	35					178	780	10.4	58.6	33.3	1.2	8.7	0.2											
(DNAワクチン)	-28	2240	0.79	39	32					223	728	9	57.7	31.3	1.7	9	0.2											
	-21	2410	0.85	38.9	33					185	722	10.2	63	41.5	0.7	12.8	0											
(DNAワクチン)	-14	2570	0.9	38.6	36					214	958	11.5	53.7	38.5	1.9	8.3	0											
	-7	2690	0.95	39.2	32					181	982	11.1	58.3	31.9	1.8	8	0											

【0043】

【表5】

表-3 (つづき) 検体番号2 (M群)

マクロ所見	PID22 AM9 時死亡	ない					
咽下腺	左に出血斑	咽水	5ml、黄色透明粘稠	肺	針尖大一あわ粒状の点状出血、びまん性	心臓	特になし
咽頭	咽粘膜に軽度炎症	大脳	頭頂部白色結節	小腦		右大脳筋肉	著変なし
脳膜	結節性病変、両側青表面灰白色小結節状病変散在			脳膜	表面にフィブリン沈着		

〔0044〕

【表6】

表-4 検体番号3 (コントロール群)

PID B.W.	B.T.	H.	BUN	CPK	CRE	GOT	GPT	LDH	白血球	赤血球	Hb	分葉好中球	リンパ球	嗜球	好酸球	Sterg	下痢	脱食量	意識	神経症状	
Ave			39	33.7					244.4	900.1	10.39	55.3	33.4667	1.78667	9.36667	0.31667					
S.D.			0.62	4.63					68.54	101.2	1.35	4.709034	4.75258	0.87579	1.12339	0.32663					
Ave+2'SD(上限)			40.2	42.9	32	295	1.7	80	60	234	377.5	1103	13.09	64.71807	42.87118	3.51824	11.6134	0.97393			
Ave-2'SD(下限)			37.8	24.4	18	18	0.5	5	10		111.3	697.7	7.591	45.88193	23.9615	0.0151	7.11889	-0.3406			
(3種混合ワクチン)	-77	820	0.31	37.8	46				109	1065	13.8										
	-70	1060	0.38	38	28				209	800	8.4										
	-63	1150	0.39	38.2	32				211	749	9.7										
(3種混合ワクチン)	-58	1470	0.5	39	30				273	870	9.4										
	-49	1470	0.5	39	35				321	981	10.4										
(DNAワクチン)	-42	1800	0.61	39.2	34				315	833	10.3										
	-38	2100	0.71	39.8	33				194	932	10	53.6	32.8	2.6	10.4	0.7					
(DNAワクチン)	-28	2260	0.78	39.3	35				318	843	10	55.9	33	1.7	7.8	0.4					
	-21	2450	0.83	39.2	31				266	788	9.6	49.5	41.5	0.9	8.3	0					
(DNAワクチン)	-14	2610	0.88	39.2	33				273	1015	10.5	62.3	29.1	0.8	10	0					
	-7	2690	0.91	39.2	32				190	834	11	57.2	31	2.6	8.6	0.6					

〔0045〕

【表7】

表-4 (つづき) 検体番号3 (コントロール群)

チャレンジ	PID	B.W.	B.T.	Ht	BUN	CPK	CRE	GOT	GPT	LDH	白血球	赤血球	Hb	分葉好中球	リンパ球	単球	好酸球	Starg	下痢	摂食量	沈降	神経症状		
																						便なし	150	-
0	2860	1.39.3	35	34.1	882	1.3	32	47	471	256	891	11.6	53.3	33.4	2	11.1	0.2	-	-	-	-	-	-	-
1	2820	0.99	39	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2	3030	1.02	39.2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3	2880	0.97	39.8	33	26.4	432	1.1	35	78	587	184	1526	10.4	75.4	11.6	1.3	10.1	1.5	便なし	150	-	-	-	-
4	2850	0.98	39	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5	2780	0.94	39.4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
6	2740	0.93	39.3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
7	2700	0.91	39.8	29	22.6	630	1	63	80	371	29	817	8.2	58.1	20.5	17.8	1.9	1.6	便なし	60	+	-	-	-
8	2810	0.88	38.8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
9	2810	0.88	38.6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
10	2840	0.89	39.3	23	21.1	1870	1.2	142	184	605	30	722	6.3	75.8	18.4	4.7	0.8	0.6	便なし	100	+	-	-	-
11	2630	0.89	40.2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
12	2600	0.88	40.3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
13	2560	0.88	40.1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
14	2510	0.85	40.4	16	21.1	458	0.9	102	128	848	83	672	5.6	87.2	11.3	0.9	0.6	0	便なし	80	+	-	-	-
15	2500	0.84	40.4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
16	2500	0.84	39.7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
17	2470	0.83	39.6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
18	2606	0.85	39.7	19	22.2	450	1.5	76	112	734	29	499	5.2	77.8	17.8	1.7	2.7	0.2	便なし	70	+	-	-	-
19	2485	0.84	40.1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
20	2550	0.88	40.1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
21	2550	0.86	40.3	18	21.4	168	1.4	51	118	368	97	846	5.5	78.5	17.1	1.8	2.2	0.4	便なし	110	-	-	-	-
22	2625	0.89	39.7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
23	2685	0.81	40.1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
24	2680	0.91	40.1	19	18.7	418	1	354	370	459	50	523	5.3	80.9	6	0.9	1.9	0.4	便なし	92	-	-	-	-
25	2650	0.9	40.3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
26	2630	0.89	40.2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
27	2615	0.88	39.9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
28	2575	0.87	39.3	31	18.9	652	0.8	107	125	272	138	824	8.8	98.2	1.5	1.8	0	0.5	便なし	0	-	-	-	-
29	2530	0.86	38.9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
30	2500	0.84	38.3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
31	2445	0.83	37.5	36	31.9	2458	0.7	417	230	847	243	1019	9.3	98.1	0.5	1.5	0	0	便なし	5	++	-	-	-

マクロ所見 PID31 午後から PID32 午前の間に死亡

尿水 220ml

【0046】

【表8】

チャレンジ	PID	B.W.	B.T.	Ht	BUN	CPK	CRE	GOT	GPT	LDH	白血球	赤血球	Hb	分葉好中球	リンパ球	単球	好酸球	Starg	下痢	摂食量	沈降	神経症状				
																						便なし	150	-		
0	2900	1.39.3	33	31.4	480	1	27	57	530	189	799	10.6	41.7	45.6	2.3	10.4	0	-	-	-	-	-	-	-	-	
1	2800	1.39.3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
2	2840	1.01	39.1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
3	2910	1.38.8	26	23.2	1884	0.9	62	50	1396	42	615	8.1	61.8	29.6	1.8	5.9	1	便なし	135	-	-	-	-	-	-	
4	2880	0.99	39.2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
5	2850	0.98	38.0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
6	2810	0.97	38.7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
7	2720	0.94	39.5	23	20	707	1	261	343	504	138	607	6.9	53.3	24.7	20.9	0.3	0.6便なし	55	+	-	-	-	-	-	-
8	2630	0.91	38.4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
9	2700	0.93	39.1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
10	2710	0.93	39.4	18	20.1	396	1.1	143	378	308	99	1348	5.3	78.8	15.4	1.3	0.3	3.9便なし	30	+	-	-	-	-	-	-
11	2620	0.9	38.0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
12	2620	0.9	39.1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
13	2650	0.91	39.2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
14	2680	0.92	39.1	22	28.7	330	1.4	145	247	535	50	641	6.3	56.8	41.1	0.8	1.3	0.3	155	+	-	-	-	-	-	-
15	2720	0.94	39.4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
16	2740	0.94	39.3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
17	2780	0.95	38.9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
18	2780	0.98	39.5	24	28	608	1.5	91	228	708	52	872	6.6	60.8	31.4	1.9	5	0.8便なし	120	+	-	-	-	-	-	-
19	2835	0.98	40.0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
20	2820	0.97	40.1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		

【0047】

【表9】

表-5 〈つづき〉 検体番号4 (コントロール群)

PID	B.W.	B.T.	HR	BUN	CPK	CRE	GOT	GPT	LDH	白血球	赤血球	Hb	分類	好中球	リンパ	単球	好酸球	Stem	下痢	筋肉量	皮膚	神経症状	
チャレンジ	21	2630	0.98	39.8	23	27.7	41.6	1.5	62	128	341	5	785	6.7	50.2	40.6	0.9	7.6	0.5	80	—		
	22	2655	0.98	40.0																100	—		
	23	2640	0.98	39.8																90	+		
	24	2688	0.98	39.5	25	23.5	258	1.6	43	94	387	48	598	6.7	50.3	42.3	1	5.1	1.3	便なし	110	+	
	25	2620	1.01	39.9																100	++		
	26	2600	1.40	0																75	+		
	27	2622	1.01	39.7																60	+		
	28	2610	1.38	8	28	21.5	268	1.4	117	204	166	83	696	7.4	78.3	20.9	0.6	0.5	1.8	便なし	16	+	
	29	2650	0.98	39.9																50	+		
	30	2640	0.98	39.5																45	+		
	31	2650	0.98	39.3	26	17.8	2678	1.3	85	107	388	109	778	8	89.3	7.8	1	0.6	0.7	便なし	85	+	
	32	2630	0.98	39.9																70	+		
	33	2640	0.98	39.8																70	+		
	34	2645	0.98	39.7																60	+		
	35	2640	0.98	38.9	27	21.7	144	1.1	81	58	152	103	643	7	87.7	7.4	4.1	0	0.8	便少し	80	+	
	36	2620	0.97	38.8																160	+		
	37	2600	1	39.0																85	+		
	38	2605	1	38.9																60	+		
	39	2610	1	38.7																30	+		
	40	2620	1.01	38.3																10	+		
	41	2610	1	38.3																10	+		
	42	2600	1	38.9	37	35.2	2750	0.9	138	65	630	263	910	10.2	97.5	0.9	0.7	0	0.8	便なし	10	+	
	43	2640	0.98	33.8	24	163	2058	3.5	174	80	447	381	597	7	93.4	0.7	1.2	0	0.7	便なし	+		

マクロ所見 PID43、著しい体温低下、安楽死

胸 杏 350ml 胸 杏 350ml

2000 JOURNAL OF CLIMATE

直供 小號直直徑 2-3mm

表10)

表一六 檢体

PD B.W. B.T. H. BUN

品種名	S.E.	生長率										平均株高	葉総面積	葉総葉数	葉総葉重	葉総葉質	
		葉	茎	葉	葉	葉	葉	葉	葉	葉	葉						
Ave		38.3	28.8									142.1	934	9,342	60,033.3	24.55	3,633.3
S.D.		0.57	2.38									48.68	231.8	1,747	6,580.805	7,736.47	1,726.85
Ave+2*SD(上限)		39.4	33.8	32	295	1.7	80	80	234	236.4	1397	12.84	73,194.94	40,022.9	7,087.03	13,858.1	0.83471
Ave-2*SD(下限)		37.1	24.1	18	18	0.5	5	10	48.72	470.8	5,848	48,871.72	9,077.08	0.17984	7,077.27	0.06529	
(3種混合ワクチン)	-77	810	0.43	38.3	30							208	897	9.3			
	-70	870	0.47	38.9	26							186	748	8.3			
	-63	900	0.48	38.5	29							161	788	8.5			
(3種混合ワクチン)	-58	1030	0.55	38.4	30							239	848	8.5			
	-49	1130	0.6	38.8	30							151	885	9.7			
(DNAワクチン)	-42	1250	0.67	38.5	25							133	1329	7.9			
	-35	1310	0.7	37.7	31							131	882	9.2	54.1	28.1	6.2
(DNAワクチン)	-28	1620	0.87	38.2	26							133	739	7.7	66.8	20.8	4.3
	-21	1430	0.76	38.9	30							114	850	9.1	51.3	37.2	0.9
(DNAワクチン)	-14	1620	0.87	38.2	32							105	937	9.7	63.6	17.7	2.7
	-7	1690	0.9	38.7								71	1488	14.2	62.1	22.1	4.5

〔.0049〕

【表11】

表-6(つづき) 検体番号5(コントロール群)

胸水 ほとんどなし 腹水

肝臟 白疕

質が薄い

アーティスト・アカデミー

(0050)

〔表12〕

表-7 検体番号6 (N群)

PID	B.W.	FIPV cat																				
		B.T.	HR	BUN	CPK	CRE	GOT	GPT	LDH	白血球	赤血球	Hb	分葉好中球	リンパ球	单球	好酸球	Storg	下痢	便食量	比算	神経症状	
Ave		39.3	30.5							196.8	858.2	9.525	49.58333	37.85	1.16867	9.11687	0.2					
S.D.		0.4	1.27							51.77	133.5	0.705	6.319852	1.61802	0.45497	2.03685	0.30822					
Ave+2SD(上限)		401.	33	32	285	1.7	60	60	234	300.4	1123	10.93	62.22284	41.088	2.07681	13.2384	0.81944					
Ave-2SD(下限)		38.5	28	18	18	0.5	5	10	93.3	589.1	8.115	38.94403	34.614	0.25672	4.99698	-0.4164						
(3種混合ワクチン)	-77	960	0.35	38.7	29					136	728	8.1										
	-70	1068	0.4	38.7	28					170	658	8.2										
	-63	1140	0.42	38.3	30					245	686	9.9										
(3種混合ワクチン)	-58	1380	0.6	39	28					154	1073	9.7										
	-49	1490	0.54	39.2	32					200	713	9										
(DNAワクチン)	-42	1763	0.64	39.3	31					289	928	9.5										
	-35	2040	0.74	39.8	31					187	908	9.8	51.8	40.1	1.7	8.4	0					
(DNAワクチン)	-28	2240	0.82	39.8	32					264	908	9.7	53.8	35.9	1.4	8.8	0					
(DNAワクチン)	-21	2040	0.74	39.8	30					215	718	9.1	49.4	38.3	0.6	11.9	0					
	-14	2440	0.89	39.9	31					141	776	9.5	38	39.2	1.3	8.8	0.3					
	-7	2630	0.98	39.5	30					158	994	10.4	51.8	39.3	1	7.8	0.7					
チャレンジ	0	2740	1.39	8	33	34.5	260	1.4	25	54	408	203	987	11.4	52.8	34.3	1.1	11.5	0.2			
	1	2850	0.97	39.9															270			
	2	2740	1	39.5															240			
	3	2760	1.01	39.5	31	22.9	628	1	43	62	1048	52	601	10.1	52.8	14.3	1.1	9.6	3	300		
	4	2740	1	39.8															250			
	5	2840	1.04	39.9															片方下痢	170		
	6	2840	1.04	39.5															片方下痢	170		
	7	2840	1.04	39.5	29	28.9	1813	1.4	92	96	638	60	965	8.3	39.9	43.1	15.4	0	1.6	240		
	8	2850	1.04	38.4															250			
	9	2840	1.07	39.9															便なし	300		
	10	2660	1.08	39.5	22	20.7	386	1.2	43	91	454	75	565	5.9	70.8	22.5	2.5	3.9	0.3	片方下痢	300	
	11	2630	1.07	39.8																300		
	12	3000	1.09	38.8																310		
	13	3150	1.15	38.1																280		
	14	3040	1.11	39.5	27	22.2	591	1.2	60	67	810	287	807	7.6	59.7	35.1	0.8	3.2	1.3	290		
	15	3015	1.1	38.2																325		
	16	3180	1.16	39.2																280		
	17	3240	1.18	39.5																290		
	18	3260	1.19	39.8	29	28.3	373	1.6	97	110	1044	88	708	7.8	28.5	61.1	0	9.3	1	下痢	200	
	19	3220	1.18	39.7															片方下痢	290		
	20	3275	1.2	39.7															下痢	220		

【0051】

【表13】

表-7 (つづき) 検体番号6 (N群)

PID	B.W.	FIPV cat																			
		B.T.	HR	BUN	CPK	CRE	GOT	GPT	LDH	白血球	赤血球	Hb	分葉好中球	リンパ球	单球	好酸球	Storg	下痢	便食量	比算	神経症状
21	3255	1.19	39.1	35	28.3	245	1.4	24	67	350	132	824	10.2	62.9	26.9	0.4	9	0.6	下痢	90	-
22	3160	1.15	38.5															下痢	300	-	
23	3175	1.18	39.6																170	-	
24	3250	1.19	38.2	33	22.2	246	1.2	33	57	550	106	810	9.2	43	45.9	0.7	10.5	0	軟便	220	-
25	3380	1.24	38.8																軟便	245	-
26	3395	1.24	38.1																軟便	245	-
27	3605	1.21	38.8																270	-	
28	3575	1.3	39.5	30	23.1	208	1.2	29	42	191	95	965	8.3	59.2	30.9	0.3	8.8	1	軟便	250	-
29	3610	1.32	38.2																軟便	240	-
30	3720	1.36	39.2																軟便	205	-
31	3735	1.36	39.3	31	27.3	594	1.6	31	51	282	217	887	8.1	85	29.2	0.3	4.3	1.1	軟便	200	-
32	3755	1.37	39.4																軟便	230	-
33	3795	1.38	39.5																便少し	255	-
34	3860	1.41	38.8																便少し	250	-
35	3860	1.41	39.4	30	26.4	265	1	21	43	201	125	720	7.8	84.4	42	0.5	4.2	0.5		200	-
36	3830	1.4	38.5																便少し	250	-
37	3900	1.42	39.0																便少し	235	-
38	3770	1.38	39.1																便なし	245	-
39	3870	1.41	39.2																便なし	280	-
40	3835	1.4	39.2																便なし	230	-
41	3910	1.43	39.3																便なし	260	-
42	3960	1.45	39.6	33	29.5	449	1.3	27	56	224	112	814	9.5	43.1	48.8	0.2	6.9	0.9	便なし	260	-
43	4080	1.49	38.9																便なし	260	-
44	>4100		38.3																	260	-
45	>4100		38.9																	260	-
46	>4100		38.8																	240	-
47	>4100		38.9																	240	-
48	>4100		39.2																	260	-
49	>4100		39.2	37	30.7	775	1.4	25	52	177	144	850	10.5	48.3	47	0	5.8	0.9		260	-
50	>4100		38.7																	240	-
51	>4100		38.3																	245	-
52	>4100		39.5																	260	-
53	>4100		39.7																	260	-
54	>4100		38.6																	250	-
55	>4100		38.8																	240	-
56	>4100		40.2	34	31.2	173	1.4	20	40	133	143	876	10.1	50.8	40.7	0.2	7.5	0.2		260	-

</

表-8 検体番号7 (N群)

PID B.W.	B.T.	Ht	BUN	CPK	CRE	GOT	GPT	LDH	白血球	赤血球	Hb	分葉好中球	リンパ球	单球	好酸球	Steng	下痢	摂食量	沈降	神経症状
Ave	39.2	31.1							136	707.8	9.658	62.51667	21.9567	2.5	12.8	0.51667				
S.D.	0.32	2.45							61.03	245.9	0.672	5.673008	6.51253	1.02713	3.38169	0.42071				
Ave+2SD(上限)	39.8	36	32	285	1.7	80	60	234	259.1	1260	11.2	73.68268	34.9917	4.55428	19.524	1.35809				
Ave-2SD(下限)	38.6	28.2	18	18	0.5	5	10		12.98	298	8.513	51.17065	8.94161	0.44574	6.07601	-0.3248				
3種混合ワクチン	-77	885	0.44	38.9	34				293	738	10.9									
	-70	980	0.5	39.2	28				105	775	8.9									
	-63	1030	0.53	39.4	34				134	978	10.5									
3種混合ワクチン	-68	1220	0.63	38.8	27				151	910	9									
	-48	1175	0.6	39.1	33				93	785	10.2									
(DNAワクチン)	-42	1250	0.64	39.3	28				50	1068	9.9									
	-35	1440	0.74	39.9	31				163	688	9.2	65.6	18.9	1.6	13.1	0.4				
(DNAワクチン)	-28	1640	0.84	39.3	32				154	759	8	66	21.9	1.8	9.8	0.5				
(DNAワクチン)	-21	1640	0.84	39.4	32				131	842	9.7	58.8	19.6	2.5	17.9	1.3				
(DNAワクチン)	-14	1770	0.91	38.8	30				110	110	10	53.7	33.8	1.5	10	0.2				
	-7	1820	0.83	39.3	32				104	638	10.2	66.3	18	4	11	0.7				

【0053】

【表15】

表-8 (つづき) 検体番号7 (N群)

PID B.W.	B.T.	Ht	BUN	CPK	CRE	GOT	GPT	LDH	白血球	赤血球	Hb	分葉好中球	リンパ球	单球	好酸球	Steng	下痢	摂食量	沈降	神経症状		
チャレンジ	0	1950	1.99	32	32.2	1283	1.3	57	75	805	144	868	10.8	64.4	19.6	3.5	15	0		-		
	1	1940	0.99	39.1														270	-			
	2	2030	1.04	39.0														240	-			
	3	2055	1.05	39.7	31	30	367	1.3	39	84	377	111	868	9.8	80.8	9.2	1.4	7.9	0.6	300	-	
	4	2140	1.1	39.9														250	-			
	5	2050	1.05	39.5														片方下痢	170	-		
	6	1990	1.02	39.1														片方下痢	170	-		
	7	1930	0.99	39.1	23	22.3	521	1.2	70	62	280	31	573	6.4	80.3	6	12	0.4	1.2	240	-	
	8	1930	0.99	38.4														250	+			
	9	1980	1.01	39.1														便なし	300	-		
	10	2000	1.03	38.9	19	24.1	1882	1.3	135	112	890	43	639	5.3	74.7	16.2	3.1	0.8	5.2	片方下痢	300	-
	11	2020	1.04	38.7														300	-			
	12	2100	1.08	38.8														310	-			
	13	2140	1.1	39.0														260	-			
	14	2120	1.09	39.9	22	19.2	421	1.1	44	82	398	125	542	5.9	87.4	9	2	0.8	0.8	290	-	
	15	2030	1.04	40.0														325	-			
	16	2070	1.05	40.2														280	+	後肢ふらつき、後肢運動障害、右前肢屈く上がる		
	17	2020	1.04	40.4														230	+	後肢運動障害		
	18	2015	1.03	40.9	24	28.2	388	1.5	55	82	480	38	975	8.5	88.4	7.2	2.4	0	1	200	++	右後肢に神経症状
	19	2050	1.05	40.6														280	+			
	20	1850	1.4	40.4														220	+			
	21	1830	0.99	39.5	22	29.2	1152	1.2	71	68	292	49	681	6.3	88.9	5.2	7	0.5	0.5	90	+	
	22	1800	0.97	40.6														300	+	ふらつき		
	23	1895	0.97	40.4														28	+	後肢麻痺、呼吸困難		
	24	1880	0.66	39.5	23	21.5	1389	1.1	76	82	514	40	677	6.7	90.7	2	7.3	0	0	35	+	後肢麻痺
	25	1830	0.94	39.7														30	+	後肢麻痺、便なき声		
	26	1790	0.92	38.9	26	20	3454	0.9	112	65	412	63	684	7	97	1.4	0.5	0		++	便として動けない	
マクロ所見																						
肺																						
肝腫																						
大脳																						
硬膜を切った時、出血あり																						
骨膜																						
動度出血																						
腹水																						
滲出性腹水約8ml																						

【0054】

【表16】

表-9 検体番号8 (N群)

PID B.W.	B.T.	Ht	BUN	CPK	CRE	GOT	GPT	LDH	白血球	赤血球	Hb	分葉好中球	リンパ球	单球	好酸球	Steng	下痢	摂食量	沈降	神経症状	
Ave	39.2	33.8							866.3	866.3	10.2	49.90333	37.4167	1.45	10.4167	0.51667					
S.D.	0.53	1.69							123.9	120.8	0.662	15.35178	15.4336	0.53852	4.29244	0.69785					
Ave+2SD(上限)	40.3	38.9	32	295	1.7	80	60	234	1114	1108	11.52	80.63688	88.2833	2.52703	19.0015	1.81237					
Ave-2SD(下限)	38.2	30.1	18	0.5	6	10			618.6	624.7	8.875	19.22978	8.5494	0.37287	1.8318	-0.878					
3種混合ワクチン	-77	960	0.33	38.9	35				183	713	10.2										
	-70	1050	0.37	38.9	31				279	888	9										
	-63	1130	0.39	38.3	38				318	718	10.2										
3種混合ワクチン	-68	1350	0.47	38.1	31				363	1028	9.8										
	-49	1360	0.47	38.9	35				288	918	10.5										
(DNAワクチン)	-42	1530	0.53	39	34				207	983	10.9										
	-35	1800	0.63	40	33				299	805	10.1	44.9	38	2.1	14.9	0					
(DNAワクチン)	-28	1890	0.66	39.5	32				233	708	9.1	49	34.3	1.4	15.2	0					
	-21	2020	0.7	39.5	32				244	780	9.4	40.3	51.4	1.1	6.6	0.7					
(DNAワクチン)	-14	2230	0.78	39.7	34				201	955	10.9	38.2	52.4	0.7	8.3	0.7					
	-7	2650	0.92	39.7	34				354	989	10.5	76.2	14.5	1.7	7	1.7					
チャレンジ	0	2870	1.39.4	35	27.8	868	1	49	33	89	299	947	11.8	54	33.9	1.7	10.5	0		-	
	1	2820	1.02	39.3														快便	150	-	
	2	2850	1.03	39.5														便なし	135	-	
	3	2870	1.39.8	31	22.6	299	0.9	16	65	650	74	882	9.8	69.7	28.3	0.3	3	0.8	100	-	

【0055】

表-9 (つづき) 検体番号8 (N群)

ID	B.W.	B.T.	Ht	BUN	CPK	CRE	GOT	GPT	LDH	白血球	赤血球	Hb	FIPV cat						下痢	摂食量	沈鬱	神経症状
													分葉好中球	リンパ球	単球	好酸球	Stmp	便なし				
チャレンジ	4	2890	1.01	39.8														110	-			
	5	2850	0.99	39.7														130	-			
	6	2860	1.39.1															40	-			
	7	2810	0.68	39.2	23	28.8	487	1.4	113	152	340	43	729	6.6	43.7	42.7	12.6	0	0.2	95	-	
	8	2780	0.97	39.0														100	-			
	9	2880	1.39.2															130	-			
	10	2780	0.97	39.3	22	23.8	574	1.2	65	213	914	114	854	6	77.8	18.6	1.1	2	0.7	下痢	160	-
	11	2900	1.01	39.1														180	-			
	12	3000	1.05	38.8														120	-			
	13	3020	1.08	39.1														150	-			
	14	3040	1.08	40.1	20	18.8	610	1	53		858	115	597	5.4	71	25.8	0.8	2.3	0.3		180	-
	15	3010	1.05	39.9														140	-			
	16	3080	1.07	40.0														170	-			
	17	3130	1.09	40.2														180	-			
	18	3170	1.1	40.2	21	19.7	516	1.2	89	93	1848	46	602	5.4	76.4	20.3	0	4	0.2		15	-
	19	3165	1.1	39.8														70	-			
	20	3105	1.08	39.7														80	+			
	21	3086	1.08	39.5	25	19.4	615	1.1	73	97	345	114	794	6.9	84.1	11.8	0.6	2.9	0.6	下痢	90	+
	22	3105	1.08	40.0														90	+			
	23	3146	1.1	40.0														70	±			
	24	3135	1.09	39.7	27	19.4	3012	1.1	97	77	1060	62	853	6.9	80	18.5	1.3	0.5	0.3	便なし	15	+
	25	3120	1.09	40.0														28	+			
	26	3085	1.08	40.7														5	+			
	27	3080	1.07	40.3														0	+			
	28	2985	1.04	40.1	31	21.4	233	0.9	79	47	191	133	833	7.9	94.5	4.1	0.3	0	1.1	便なし	0	++
	29	2895	1.01	39.7														5	++			
	30	2855	0.99	39.0														0	++			
	31	2780	0.97	38.5	37	23.8	3586	0.6	285	124	910	110	825	9.3	99.1	0	0.8	0	0	便なし	5	++
	32	2755	0.98	37.2														便なし		++		

マクロ所見 PID31. 安楽死
糞水 50ml 粘膜 右肺後葉に点状出血、針尖大
糞水 400ml 肝臓 肝臓 心臓 心臓水多量

【0056】上記表において、BWは体重、BTは体温、Htはヘモトクリット値、Hbはヘモグロビンを各々表す。

2 FIPVのN-タンパク質をコードする遺伝子を用いたDNAワクチンの検討

RT-PCRによりクローニングされたN遺伝子を、pCAGGSに組み込んだ(N/pCAGGS)。生理食塩水に溶かしたプラスミドDNAをSPFネコの大腿二頭筋に一匹当たり200μg接種した。さらに2週間間隔で計3回の免疫を行った。この間、臨床症状はみられなかった。最終免疫より2週間後に強毒ウイルス株であるM91-267株を1×10⁶PFU/1ml/1匹に腹腔内接種した。

【0057】攻撃試験後の結果を項目別に以下に示す。

① 臨床症状

〔コントロール群(検体番号3~5)〕コントロール群では接種後1日目から体重が減少し始め、検体番号3(表-4に示す)では8~22日目の間で、検体番号5(表-6に示す)では5~10日目の間で10%以上の減少がみられた。2頭共その後いったん回復したが、検体番号3で25日目、検体番号5で24日目以降、ふたたび10%以上の減少を示した(図5参照)。体温は検体番号3で15、19~21、22~26日目に、検体番号4(表-5に示す)で19、20、22、25日目に、検体番号5で15~17、19、21日目に40°C以上の発熱を示した。

【0058】ヘマトクリット値は、検体番号5、4、3でそれぞれ攻撃後3、7、10日目から25%以下に減少し、検体番号4と3はそれぞれ24と28日目に回復したが、検体番号5では以後25%以上に回復すること

はなかった(図7)。白血球数は、検体番号3で7、10、18、24日目に、検体番号4で3、14~24日目に、検体番号5で3、18、24日目に6000/μl以下であった(図6)。白血球百分比は、分葉好中球が80%以上となったのは、検体番号3で14、24~31日目、検体番号4で31~43日目、検体番号5で10~26日目であった。単球は3頭共7日目に10%以上に増加し、好酸球は検体番号3で10、14、28、31日目に、検体番号4で31~43日目に、検体番号5で7、18~26日目に1%以下に減少した(表-4~6)。

【0059】下痢は、検体番号3で3、4日目に、検体番号4で9日目に見られた。食欲不振は、検体番号3で4日目以降ずっと続き、28日目以降は摂食量がほぼ0gとなった。検体番号4でも4日目以降食欲不振となつたが、10~21日の間いったん食欲が回復していた。しかし、28日目以降の摂食量はほぼ0gになった。検体番号5では接種後1日目からほぼ毎日食欲不振を示した。沈鬱は、検体番号3で5~19日、検体番号4で4~43日、検体番号5で19~26日の間でみられた。神経症状は検体番号4ではみられなかったが、検体番号3では15~18、20日目に後肢のふらつき、旋回運動がみられ、検体番号5では24~26日に後肢麻痺、発作がみられた。

【0060】〔N群(検体番号6~8)〕N群では、接種後1日目から3頭中2頭で、他の1頭は4日目から体重の減少がみられた。その後は回復と減少を繰り返したが、コントロール群で10%以上の体重減少を示した日のべ31日間あったのに対して、N群では最も大きい減少を示した検体番号7でも最大9%の減少にとどま

り、10%以上は減少しなかった(図5、表-8)。体温は検体番号7(表-8に示す)で15~20, 22, 23日目に、検体番号8(表-9に示す)で14, 16~18, 21, 22, 25~28日目に40°C以上に発熱した。検体番号6(表-7に示す)では発熱はみられず、他の2頭では発熱に関してコントロール群との差はなかった。

【0061】白血球数は、検体番号6で3日目に、検体番号8で7日目に6000/ μ l以下に減少したが、すぐに回復し、検体番号8では18日目に再び減少したが、21日目には回復した。検体番号7は7, 10, 18~24日目に6000/ μ l以下の値を示した。N群ではコントロール群と比較して、白血球数が6000/ μ l以下に減少し始める時期は同じであったが、一時的に回復するのが早かった(図6、表-7~9)。ヘマトクリット値では、25%以下に減少したのは検体番号6で10日目、検体番号7で7~24日目、検体番号8で7~18日目であった。N群とコントロール群でヘマトクリット値が25%以下に減少する時期はほぼ等しく、差はみられなかったが、N群の1頭では明らかに回復が早かった(図7)。白血球百分比では、検体番号7, 8ではコントロールとの差がみられなかつたが、検体番号6ではほとんど異常値がみられなかつた。下痢は検体番号6もしくは検体番号7で5, 6, 10, 19日目にみられた。検体番号6, 7は22日目まで同ケージに収容していたため下痢がどちらにおこっていたのかは不明である。18, 20~22日目は検体番号6, 7共に下痢をしていた。検体番号8では10, 20~22日目に下痢を起こした。下痢はN接種群でコントロール群よりも頻繁にみられた(表-7~9)。

【0062】食欲不振は検体番号6で21日目、検体番号7で21, 22~26日にみられたが、先に述べた理由により検体番号7で食欲不振が正確にはいつからおこっていたのか不明である。検体番号8では6, 7日目にいたん摂食量が減少したが、すぐに回復した。検体番号8が再び食欲不振を起こすのは18日目以降で特に26日目以降は摂食量がほぼ0gとなった。沈鬱は検体番号7で16日目以降、検体番号8で20日目以降、死亡するまで続いた。神経症状は、検体番号7のみでみられ、16~18日目、22~25日目に後肢麻痺がみられ、26日目には横臥して動けない状態であった。上記の臨床症状を表-1に従ってスコア化した結果(図4)、接種後3, 7, 10, 14日目でN群のポイントは、コントロール群の平均より低く、このうち10日目では、有意差が見られた($p < 0.05$)。コントロール群でスコアが上昇し始める3日目にはN群のスコアは0ポイントで臨床症状の発現が遅くなつた。14日目以降は、N群の検体番号7でコントロール群と同じか、若しくはそれ以上に高いポイントとなつたが、他の2頭ではコントロール群の平均より低かった。N群の検体番号

7は26日目に、検体番号8は32日目に瀕死となり、そのため28日と35日のN群のスコアが高くなつてゐる。検体番号6は常に1ポイント以内の低い値を示しており、25日以降は0ポイントとなつた。以上より、N群ではコントロール群よりもスコアが上昇し始めるのが遅く、また臨床スコアが低いという結果になつた。

【0063】②体重(図5)

コントロール群、N群共に接種後(PID)1日目に1~2%の減少が見られた。コントロール群では、いたん回復したが、再び減少し始め、8日目までに接種前と比べて10.7%減少した。その後、検体番号3(表-4)では接種後17日目までにさらに5%減少したがその後、増加を始め、21日目には接種前と比べて4%の減少となつた。検体番号4, 5は9日目以降増加したが、検体番号5は18日目を境に減少し始め、その後回復は見られなかつた。検体番号4は21日目までに8%回復した。コントロール群全体では、接種前と比べて接種後21日目に平均7%減少した。N群では2日目以降検体番号7が2%以内で増減を繰り返しながらも一定の値を保ち、さらに検体番号6, 8では増加を示し、N群全体の平均では接種後21日目に接種前と比べて8.7%の増加をしめした。6~19日の間コントロール群との間に有意差があつた($p < 0.05$)。結果として、N/pCAGGS群はコントロール群よりも体重の減少が有意に軽減されていることが示された。

【0064】③白血球数(図6)

コントロール群では検体番号4, 5が接種後3日目に6000/ μ l以下に減少し、検体番号3は7日目に3000/ μ l以下に減少した。検体番号4, 5は7日目には10000/ μ l以上に回復したが、検体番号4は14日目、検体番号5は18日目にふたたび5000/ μ l以下に減少した。N群では検体番号6で3日目に6000/ μ l以下に減少し、検体番号7, 8では7日目に減少した。しかし3頭共に14日目には10000/ μ l以上に回復し、検体番号6では以後6000/ μ l以下に減少することはなかつた。検体番号7, 8はふたたび18日目に5000/ μ l以下に減少し、検体番号7では以後回復は見られなかつた。検体番号8は21日目に、10000/ μ l以上に回復し、以後6000/ μ l以下に減少することはなかつた。このようにコントロール群で10000/ μ l以下であった14日目にN接種群で平均して17600/ μ lに増加しており、N/pCAGGS接種により白血球数の回復が早まる結果となつた。

【0065】④ヘマトクリット値(図7)

コントロール群では接種後3日目には、接種前と比べて平均5%減少した。その後も減少を続け、検体番号5では3日目、検体番号3は10日目に25%以下となつた。検体番号4は14日目にさらに18%に減少したが、18日目以降は20%以上に増加した。検体番号5

と検体番号3は7日目と14日目にそれぞれ20%以下に減少し、21日目までに20%以上に回復することはなかった。これに対し、N群では3日目にはほとんど減少が見られず、25%以下となったのは、検体番号7, 8が7日目、検体番号6が10日目であったが、検体番号6では14日目には27%に回復し、その後も増加して21日目には35%となった。検体番号7は10日目に19%に減少したが、14日目には22%に回復し、21日目までに20%以下に再び減少することはなかった。検体番号8は、21日目に25%に回復した。N群ではコントロール群と比べてヘマトクリット値の減少が遅く、その程度も低く、かつ回復が早い結果となった。

【0066】⑤赤血球数(図8)

コントロール群では接種後3日目に2頭が $200 \times 10^4 / \mu\text{l}$ の減少を示した。このうち検体番号5は7日目 $990 \times 10^4 / \mu\text{l}$ 、検体番号4は10日目に $1348 \times 10^4 / \mu\text{l}$ に回復したが、14日目には再び検体番号4で $650 \times 10^4 / \mu\text{l}$ 以下、検体番号5で $500 \times 10^4 / \mu\text{l}$ 以下に減少した。検体番号3は7日目から減少を始め、21日目には $550 \times 10^4 / \mu\text{l}$ 以下となった。N群では接種後3日目にはコントロール群ほどの著しい減少はみられなかったが、検体番号7が7日目に、検体番号6が10日目に、検体番号8が14日目に大きく減少し、 $550 \times 10^4 / \mu\text{l}$ 以下となった。しかし3頭共にその後回復を示した。このようにN群は3日目から減少したが、減少の程度はコントロール群よりも小さいものであり、14日目以降著しく減少するコントロール群に対し、N群では増加がみられた。

【0067】⑥生存期間

コントロール群では検体番号3が接種後31日目、検体番号4が43日目、検体番号5が26日目に死亡しており、生存期間の平均は33.3日である。これに対し、N群では検体番号7が26日、検体番号8が31日目とコントロール群との差はみられないが、検体番号6は150日以上生存しており、N/pCAGGS接種により発症防御に成功した。

【0068】⑦ウイルス中和試験(図15)及びウェスタンプロット解析

採取した血漿を用いてウイルス中和試験を行った。pCAGGS接種群(コントロール群)ではウイルス接種後14日目から上昇し始めたが、N接種群では18日目からウイルス中和抗体値が上昇し始めた。両群とも接種前には中和抗体は存在しなかった(図15)。接種前の抗体値はウェスタンプロットでも検出できなかった。

【0069】3. FIPV M遺伝子を用いたDNAワクチン(比較例)

N遺伝子と同様にRT-PCRによりクローニングされたM遺伝子を、pCAGGSに組み込んだ(M/pCAGGS)(図9)。生理食塩水に溶かしたプラスミドDNAをSPFネコの大脚二頭筋に一匹当たり $200 \mu\text{g}$

接種した。さらに2週間間隔で計3回の免疫を行った。この間、臨床症状はみられなかった。最終免疫より2週間後に強毒ウイルス株であるM91-267株を $1 \times 10^6 \text{ PFU} / 1 \text{ ml} / 1 \text{ 匹}$ に腹腔内接種した。攻撃試験後の結果を項目別に以下に示す。

【0070】①臨床症状(図10~14, 表-2, 3) M群では体重の減少が10%以上になるのがコントロール群より遅かったが、コントロール群でみられた回復がM群ではみられず、またコントロール群での減少が最大18%であったのに対し、M群では最大22%の減少を示した(図11, 表-2, 3)。体温は検体番号1で3, 5, 10~20日目、検体番号2で10~16日目に 40°C 以上の発熱をおこし、コントロール群よりも早い時期に発熱がおこった(表-2, 3参照)。白血球数はコントロール群で $6000 / \mu\text{l}$ 以下に減少したのが3日目であったのに対し、M群では10日目以降と遅かったが、コントロールでみられた回復がM群ではみられなかった(図12, 表-2, 3)。ヘマトクリット値では検体番号1, 2共に7~21日目に25%以下に減少し、コントロールとの差はみられず(図13, 表-2, 3)、また白血球百分比でも、コントロールとの差はみられなかった。下痢はみられなかったが、食欲不振は5日目以降続き、回復することはなかった。沈鬱は検体番号1で12日目以降、検体番号2で4日目以降続いた(表-2, 3)。

【0071】神経症状が初めにおこったのはM群の検体番号2で、14~16日目に後肢のふらつきが、17, 19~21日目にはそれに加えて発作もみられた。22日目には横臥、痙攣し全く動けない状態であった。検体番号1では17日目に後肢麻痺、旋回、発作がおこった。以上の臨床症状を表-1に従ってスコア化した結果(図10)、接種後3~7日間はコントロール群よりもM群のポイントの方が低いが、10日目ではM群の方が高くなかった。その後、M群ではコントロール群の平均を常に上回り、21日目では有意にコントロール群より高いポイントを示した($P < 0.05$)。接種後、22日目に検体番号2が、23日目に検体番号1が死亡したため、24日目のM群のポイントが著しく上昇している。このようにM接種群では7日目まで臨床症状の発症が抑制されているが、その後の上昇はコントロール群より早かった。

【0072】② 白血球数(図12)

コントロール群で3日目から減少が始まったのに対して、M群では、接種後7日目までは $10000 / \mu\text{l}$ 以上を示していた。M群で減少し始めたのは、10日目以降であった。検体番号1では10日目に $4200 / \mu\text{l}$ まで減少し、その後回復することはなかった。検体番号2では10日目に $7600 / \mu\text{l}$ に減少し、4日目にいたん $12500 / \mu\text{l}$ に回復したが18日目には $4200 / \mu\text{l}$ に減少した。このようにごく初期の段階では

M/pCAGGS接種により白血球数の減少が抑えられている可能性が示されたが、減少し始めてからの減少の程度はM群の方が大きく、またコントロール群では21日目に3頭中2頭で $6000/\mu l$ 以上に回復しているのに対してM群では回復がみられなかった。

【0073】③ ヘマトクリット値(図13)

コントロール群では接種後3日目に接種前と比べて5%の減少がみられたが、M群でも同様に4.5%の減少がみられた。M群では7日目に検体番号1, 2ともに25%以下に減少し、さらに検体番号1が10日目に、検体番号2が14日目に20%以下となった。検体番号2は21日目に20%に回復したが、検体番号1はさらに減少が続き、21日目には15%まで減少した。M群ではヘマトクリット値の減少がコントロール群と同程度に起こっている。

【0074】④ 赤血球数(図14)

コントロール群では接種後3日目から大きく減少したが、M群でも同様に接種後3日目には接種前と比較して $150 \times 10^4/\mu l$ 減少した。コントロール群ではその後一度回復がみられたが、M群ではその後も減少が続き、検体番号1では10日目に $474 \times 10^4/\mu l$ となり、21日目には $257 \times 10^4/\mu l$ に減少した。検体番号2では14日目に $552 \times 10^4/\mu l$ に減少し、その後も $600 \times 10^4/\mu l$ 以上に回復することはなかった。このように、M群ではコントロール群でみられた一時的な回復がみられなかった。

【0075】⑤生存期間(表-2, 3)

コントロール群での生存期間の平均が33.3日であるのに対して、M群では検体番号1が23日、検体番号2が22日と10日も短くなった。これは、M/pCAGGS接種による生存期間の延長はおこらず、かえって死期を早めたことを示している。

⑥ ウイルス中和試験(図15)及びウエスタンプロット解析

M及びコントロール群においては攻撃試験後14日目から中和抗体の上昇がみられ、コントロール群と比較してM群の方がより高い中和抗体値の上昇を示した(図15)。またM群においては4倍希釈した血清を用いても攻撃試験前の中和抗体を検出できなかった。接種前の抗体値はウエスタンプロットでも同様に検出できなかった。なお一連の実験に用いたネコ(検体番号1~8)は、病理解剖され、その病理所見より典型的なFIP症状を呈して死亡したことを確認した。

【0076】【考察】FIPVは、抗体と結合した結果、感染を増強するADE活性を有するため、既存のワクチンによる液性免疫の誘導は、かえって感染を増強することになる。このため、FIPVに対する防御には細胞性免疫の誘導が重要となるが、従来のワクチン法では、強い細胞性免疫を誘導することは困難であった。そこで今回、新しいワクチン法としてDNAワクチンによ

るFIP発症防御試験を試みた。N/pCAGGS接種群では、臨床スコアの値がコントロール群より低く、体重変化、白血球数、赤血球数、ヘマトクリット値は、いったんは減少したものの3頭中2頭で回復した。

【0077】また、N群3頭中1頭は半年以上生存しており、体重、体温、血液検査値、食欲等も正常で、FIPの発症防御に成功したといえる。さらに、最終的には死亡したものの、N群のうちの他の1頭は発症後いったんは、体重、血液検査値が回復している。これは、今回のN/pCAGGS接種によりFIPVの初期感染が防御できていたことを示している。一方、N/pCAGGS接種群での結果とは対照的に、M/pCAGGS接種群では臨床スコア、体重、白血球数、赤血球数、ヘマトクリット値など全てのデータにおいてコントロール群と有意な差がない、若しくはコントロール群よりも悪化を示す結果となった。この理由としてFIPV構造蛋白MがADEを起こすウイルス側の因子の一つであり、今回M/pCAGGSを接種することによりFIPVの感染が増強した可能性が考えられる。しかし、ワクシニアウイルスを用いたM蛋白の免疫実験では感染防御に成功していることから、M蛋白に関してはDNAワクチンとしては使用できない。

【0078】ウイルス中和試験の結果より、N/pCAGGS接種群における抗体値の上昇が他の群と比較して遅かったことは、N/pCAGGS接種により初期の感染防御には成功したが、 1×10^6 PFUという大量のウイルスで攻撃したため宿主免疫系によって排除しきれなかったウイルスが増殖したために、抗体値の上昇が遅れたと考えられる。N/pCAGGS接種群より攻撃前に回収された血清を用いたウエスタンプロット解析でも検出できなかったことは、液性免疫より細胞性免疫が主に感染防御に関与していると考えられる。一方、M/pCAGGS接種群ではウイルス中和抗体値の上昇がコントロール群と比較して急激であった。中和抗体値としては検出できなかったものの、M/pCAGGS接種により若干の中和抗体の誘導があり、記憶免疫が成立していたことが示唆される。また、DNAワクチン接種による抗体の誘導がADE様感染を引き起こした可能性も考えられる。

【0079】今回の感染実験において、N/pCAGGS接種群で完全にはFIPV防御が出来なかった理由として、① 1×10^6 PFUという大量のウイルスでの攻撃、②腹腔内投与により、生体内への直接的なウイルスの感染、が挙げられる。これらの結果、ウイルスに対する免疫が生じていても、免疫系によるウイルスの排除がウイルスの増殖速度に追いつかなかった可能性がある。しかし、自然界においてはこれほど大量のウイルスが一度に生体内に感染することは考えにくく、初期感染の防御に効果があるFIPVのNタンパクをコードする遺伝子を組み込んだDNAワクチンは、自然感染に似た最適

な接種量、接種方法とすることにより、十分効果があると考えられる。

〔0080〕

【発明の効果】以上に示したことから明らかな様に、本発明のDNAワクチンは、防御が困難であったF I P V

等のコロナウイルス感染症に対して有効に予防／治療できる。

{0081}

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<;110>; Kyoritsu Shoji Company
<;120>; DNA vaccine against coronavirus infectious disease
<;130>; P-31200
<;160>; 4
<;170>; PatentIn Ver. 2.0

[0082]

aga act ggt tgt caa tct aga tct gtc tca aga aac agg tct caa tcc	528
Arg Thr Gly Cys Gln Ser Arg Ser Val Ser Arg Asn Arg Ser Gln Ser	
165 170 175	
aga gga aga caa caa tcc aat gac caa aat aat gtt gag gat aca att	576
Arg Gly Arg Gln Gln Ser Asn Asp Gln Asn Asn Val Glu Asp Thr Ile	
180 185 190	
gta gct gtg ctt caa aaa tta ggt gtt act gat aag caa agg tca cgt	624
Val Ala Val Leu Gln Lys Leu Gly Val Thr Asp Lys Gln Arg Ser Arg	
195 200 205	
tct aaa tca aga gac cgt agt gat tcc aag tcc agg gat aca aca cct	672
Ser Lys Ser Arg Asp Arg Ser Asp Ser Lys Ser Arg Asp Thr Thr Pro	
210 215 220	
aag aac gcc aac aaa cac acc tgg aag aaa act gca ggt aag gga gat	720
Lys Asn Ala Asn Lys His Thr Trp Lys Lys Thr Ala Gly Lys Gly Asp	
225 230 235 240	
gtg aca aat ttc tat ggt gct aga agt gct tca gct aac ttt ggt gat	768
Val Thr Asn Phe Tyr Gly Ala Arg Ser Ala Ser Ala Asn Phe Gly Asp	
245 250 255	
agt gat ctc gtt gcc aat ggt aac gct gcc aaa tgc tac cct cag ata	816
Ser Asp Leu Val Ala Asn Gly Asn Ala Ala Lys Cys Tyr Pro Gln Ile	
260 265 270	
gct gag tgt gtt cca tca gtg tct agc atg ctc ttt ggc agt caa tgg	864
Ala Glu Cys Val Pro Ser Val Ser Ser Met Leu Phe Gly Ser Gln Trp	
275 280 285	
tct gct gaa gag gct gat caa gtg aaa gtc aca ctt act cac acc	912
Ser Ala Glu Glu Ala Gly Asp Gln Val Lys Val Thr Leu Thr His Thr	
290 295 300	
tac tac ctg cca aaa gat gat gcc aaa acc agc caa ttc cta gaa cag	960
Tyr Tyr Leu Pro Lys Asp Asp Ala Lys Thr Ser Gln Phe Leu Glu Gln	
305 310 315 320	
att gac gct tac aag cga cct tct cag gtg gct aag gat cag agg caa	1008
Ile Asp Ala Tyr Lys Arg Pro Ser Gln Val Ala Lys Asp Gln Arg Gln	
325 330 335	
aga aaa tct cgt tct aag tct gct gat aag aag cct gag gaa ttg tct	1056
Arg Lys Ser Arg Ser Lys Ser Ala Asp Lys Lys Pro Glu Glu Leu Ser	
340 345 350	
gta act ctt gtt gag gca tac aca gat gtg ttc gat gac aca cag gtt	1104
Val Thr Leu Val Glu Ala Tyr Thr Asp Val Phe Asp Asp Thr Gln Val	
355 360 365	
gag atg att gat gag gtt acg aac taa	1131
Glu Met Ile Asp Glu Val Thr Asn	
370 375	

【0083】

<210>; 2
 <211>; 376
 <212>; PRT
 <213>; Feline infectious peritonitis virus
 <400>; 2

Met Ala Thr Gln Gly Gln Arg Val Asn Trp Gly Asp Pro Thr Lys
 1 5 10 15
 Arg Arg Gly Arg Ser Tyr Ser Arg Gly Arg Lys Asn Asn Asp Ile Pro
 20 25 30
 Leu Ser Phe Tyr Asn Pro Ile Thr Leu Glu Pro Gly Ser Lys Phe Trp
 35 40 45
 Asn Leu Cys Pro Arg Asp Phe Gly Pro Lys Gly Ile Ser Asn Lys Asp
 50 55 60
 Gln Gln Ile Gly Tyr Trp Asn Arg Gln Ala Arg Tyr Arg Ile Val Lys
 65 70 75 80
 Gly Gln Arg Lys Glu Leu Pro Glu Arg Trp Phe Phe Tyr Phe Leu Gly
 85 90 95
 Thr Gly Pro His Ala Asp Ala Lys Phe Lys Asp Lys Ile Asp Gly Val
 100 105 110
 Phe Trp Val Ala Arg Asp Gly Ala Met Asn Lys Pro Thr Thr Leu Gly
 115 120 125
 Thr Arg Gly Thr Asn Asn Glu Ser Lys Pro Leu Lys Phe Asp Gly Lys
 130 135 140
 Ile Pro Pro Gln Phe Gln Leu Glu Val Asn Arg Ser Arg Asn Asn Ser
 145 150 155 160
 Arg Thr Gly Cys Gln Ser Arg Ser Val Ser Arg Asn Arg Ser Gln Ser
 165 170 175
 Arg Gly Arg Gln Gln Ser Asn Asp Gln Asn Asn Val Glu Asp Thr Ile
 180 185 190
 Val Ala Val Leu Gln Lys Leu Gly Val Thr Asp Lys Gln Arg Ser Arg
 195 200 205
 Ser Lys Ser Arg Asp Arg Ser Asp Ser Lys Ser Arg Asp Thr Thr Pro
 210 215 220
 Lys Asn Ala Asn Lys His Thr Trp Lys Lys Thr Ala Gly Lys Gly Asp
 225 230 235 240
 Val Thr Asn Phe Tyr Gly Ala Arg Ser Ala Ser Ala Asn Phe Gly Asp
 245 250 255
 Ser Asp Leu Val Ala Asn Gly Asn Ala Ala Lys Cys Tyr Pro Gln Ile
 260 265 270
 Ala Glu Cys Val Pro Ser Val Ser Ser Met Leu Phe Gly Ser Gln Trp
 275 280 285
 Ser Ala Glu Glu Ala Gly Asp Gln Val Lys Val Thr Leu Thr His Thr
 290 295 300
 Tyr Tyr Leu Pro Lys Asp Asp Ala Lys Thr Ser Gln Phe Leu Glu Gln
 305 310 315 320
 Ile Asp Ala Tyr Lys Arg Pro Ser Gln Val Ala Lys Asp Gln Arg Gln
 325 330 335
 Arg Lys Ser Arg Ser Lys Ser Ala Asp Lys Lys Pro Glu Glu Leu Ser
 340 345 350
 Val Thr Leu Val Glu Ala Tyr Thr Asp Val Phe Asp Asp Thr Gln Val
 355 360 365
 Glu Met Ile Asp Glu Val Thr Asn
 370 375

<;211>; 870
 <;212>; DNA
 <;213>; Feline infectious peritonitis virus
 <;220>;
 <;221>; CDS
 <;222>; (1)..(867)
 <;400>; 3

atg	cat	atg	atg	cct	ata	aga	att	tca	tgc	gaa	tta	aag	cat	aca	acc	48
Met		Met	Met	Pro	Ile	Arg	Ile	Ser	Cys	Glu	Leu	Lys	His	Thr	Thr	
1		5											15			
ccg	acg	aag	cac	tcc	ttg	ttt	gaa	cta	aac	aaa	atg	aag	att	ttg	tta	96
Pro	Thr	Lys	His	Ser	Leu	Phe	Glu	Leu	Asn	Lys	Met	Lys	Ile	Leu	Leu	
					20								25		30	
gtg	tta	gcg	tgt	gca	att	gca	tgc	gca	tgt	ggt	gaa	cgt	tat	tgc	gct	144
Val	Leu	Ala	Cys	Ala	Ile	Ala	Cys	Ala	Cys	Gly	Glu	Arg	Tyr	Cys	Ala	
					35								40		45	
atg	aaa	tct	gat	tca	gat	act	tca	tgt	cgc	aat	agt	act	act	aat	gat	192
Met	Lys	Ser	Asp	Ser	Asp	Ser	Asp	Ser	Cys	Arg	Asn	Ser	Thr	Asn	Asp	
					50								55		60	
tgt	gat	tca	tgc	ttc	aac	gga	ggt	gac	ctt	att	tgg	cat	ctt	gtc	aat	240
Cys	Asp	Ser	Cys	Phe	Asn	Gly	Gly	Asp	Leu	Ile	Trp	His	Leu	Ala	Asn	
					65								70		75	
tgg	aac	ttc	agc	tgg	tct	gta	ata	ttg	att	gtt	ttt	ata	aca	gtg	tta	288
Trp	Asn	Phe	Ser	Trp	Ser	Val	Ile	Leu	Ile	Val	Phe	Ile	Thr	Val	Leu	
						85							90		95	
caa	tat	gga	aga	ccg	caa	ttt	agc	tgg	ttc	gtt	tat	ggc	att	aaa	atg	336
Gln	Tyr	Gly	Arg	Pro	Gln	Phe	Ser	Trp	Phe	Val	Tyr	Gly	Ile	Lys	Met	
						100							105		110	
ctg	atc	atg	tgg	cta	tta	tgg	cct	att	gtt	cta	gcg	ctt	acg	att	ttt	384
Leu	Ile	Met	Trp	Leu	Leu	Trp	Pro	Ile	Val	Leu	Ala	Leu	Thr	Ile	Phe	
						115							120		125	
gat	gca	tac	tct	gag	tac	cag	gtt	tcc	aga	tat	gta	atg	ttc	ggc	ttt	432
Asp	Ala	Tyr	Ser	Glu	Tyr	Gln	Val	Ser	Arg	Tyr	Val	Met	Phe	Gly	Phe	
						130							135		140	
agt	gtt	gca	gtt	gca	gtt	gta	acg	ttt	gca	ctt	tgg	atg	atg	tat	ttt	480
Ser	Val	Ala	Gly	Ala	Val	Val	Thr	Phe	Ala	Leu	Trp	Met	Met	Tyr	Phe	
						145							150		155	
gtg	aga	tct	att	cag	tta	tat	aga	agg	acc	aaa	tca	tgg	tgg	tct	ttt	528
Val	Arg	Ser	Ile	Gln	Leu	Tyr	Arg	Arg	Thr	Lys	Ser	Trp	Trp	Ser	Phe	
						165							170		175	
aat	cct	gag	act	aat	gca	att	ctt	tgt	gtt	aat	gta	ttg	ggt	aga	agc	576
Asn	Pro	Glu	Thr	Asn	Ala	Ile	Leu	Cys	Val	Asn	Val	Leu	Gly	Arg	Ser	
						180							185		190	
tat	gtt	ctt	cct	ttt	gat	ggt	aca	cct	acg	ggt	gtt	act	ctt	act	cta	624
Tyr	Val	Leu	Pro	Leu	Asp	Gly	Thr	Pro	Thr	Gly	Val	Thr	Leu	Thr	Leu	
						195							200		205	
ctc	tca	gga	aat	tta	tat	gct	gaa	ggc	ttt	aaa	atg	tct	ggt	ggc	ctt	672
Leu	Ser	Gly	Asn	Leu	Tyr	Ala	Glu	Gly	Phe	Lys	Met	Ser	Gly	Gly	Leu	

210	215	220	
acc atc gat cat ttg cct aaa tat gtc atg att gct aca cct agt aga			720
Thr Ile Asp His Leu Pro Lys Tyr Val Met Ile Ala Thr Pro Ser Arg			
225	230	235	240
acc atc gtc tac aca tta gtt ggg aaa caa tta aaa gca act act gct			768
Thr Ile Val Tyr Thr Leu Val Gly Lys Gln Leu Lys Ala Thr Thr Ala			
245	250	255	
aca gga tgg gct tac tat gta aaa tct aaa gct ggt gat tac tca aca			816
Thr Gly Trp Ala Tyr Tyr Val Lys Ser Lys Ala Gly Asp Tyr Ser Thr			
260	265	270	
gaa gca cgt act gat aat ttg agt gaa cat gaa aaa tta tta cat atg			864
Glu Ala Arg Thr Asp Asn Leu Ser Glu His Glu Lys Leu Leu His Met			
275	280	285	
gtg taa			870
Val			

【0085】

<;210>; 4			
<;211>; 289			
<;212>; PRT			
<;213>; Feline infectious peritonitis virus			
<;400>; 4			
Met His Met Met Pro Ile Arg Ile Ser Cys Glu Leu Lys His Thr Thr			
1	5	10	15
Pro Thr Lys His Ser Leu Phe Glu Leu Asn Lys Met Lys Ile Leu Leu			
20	25	30	
Val Leu Ala Cys Ala Ile Ala Cys Ala Cys Gly Glu Arg Tyr Cys Ala			
35	40	45	
Met Lys Ser Asp Ser Asp Thr Ser Cys Arg Asn Ser Thr Thr Asn Asp			
50	55	60	
Cys Asp Ser Cys Phe Asn Gly Gly Asp Leu Ile Trp His Leu Ala Asn			
65	70	75	80
Trp Asn Phe Ser Trp Ser Val Ile Leu Ile Val Phe Ile Thr Val Leu			
85	90	95	
Gln Tyr Gly Arg Pro Gln Phe Ser Trp Phe Val Tyr Ile Lys Met			
100	105	110	
Leu Ile Met Trp Leu Leu Trp Pro Ile Val Leu Ala Leu Thr Ile Phe			
115	120	125	
Asp Ala Tyr Ser Glu Tyr Gln Val Ser Arg Tyr Val Met Phe Gly Phe			
130	135	140	
Ser Val Ala Gly Ala Val Val Thr Phe Ala Leu Trp Met Met Tyr Phe			
145	150	155	160
Val Arg Ser Ile Gln Leu Tyr Arg Arg Thr Lys Ser Trp Trp Ser Phe			
165	170	175	
Asn Pro Glu Thr Asn Ala Ile Leu Cys Val Asn Val Leu Gly Arg Ser			
180	185	190	
Tyr Val Leu Pro Leu Asp Gly Thr Pro Thr Gly Val Thr Leu Thr Leu			
195	200	205	
Leu Ser Gly Asn Leu Tyr Ala Glu Gly Phe Lys Met Ser Gly Gly Leu			
210	215	220	
Thr Ile Asp His Leu Pro Lys Tyr Val Met Ile Ala Thr Pro Ser Arg			

225	230	235	240
Thr Ile Val Tyr Thr Leu Val Gly Lys Gln Leu Lys Ala Thr Thr Ala			
245	250	255	
Thr Gly Trp Ala Tyr Tyr Val Lys Ser Lys Ala Gly Asp Tyr Ser Thr			
260	265	270	
Glu Ala Arg Thr Asp Asn Leu Ser Glu His Glu Lys Leu Leu His Met			
275	280	285	
Val			

【図面の簡単な説明】

【図1】N遺伝子のアミノ酸配列を基にした系統樹を示す図である。

【図2】M遺伝子のアミノ酸配列を基にした系統樹を示す図である。

【図3】N/pCAGGSの制限酵素切断電気泳動写真を示す図である。

【図4】FIPV接種後のN群の臨床スコアの変化を示す図である。

【図5】FIPV接種後のN群の体重変化を示す図である。

【図6】FIPV接種後のN群の白血球数変化を示す図である。

【図7】FIPV接種後のN群のヘマトクリット値変化を示す図である。

【図8】FIPV接種後のN群の赤血球数変化を示す図である。

【図9】M/pCAGGSの制限酵素切断電気泳動写真を示す図である。

【図10】FIPV接種後のM群の臨床症状スコアの変化を示す図である。

【図11】FIPV接種後のM群の体重変化を示す図である。

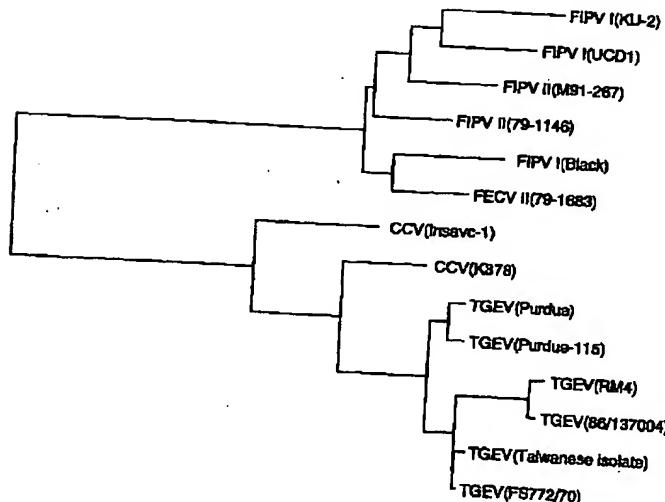
【図12】FIPV接種後のM群の白血球数変化を示す図である。

【図13】FIPV接種後のM群のヘマトクリット値変化を示す図である。

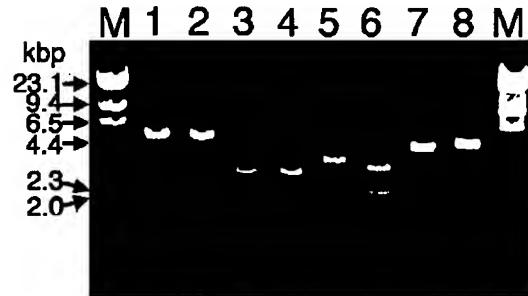
【図14】FIPV接種後のM群の赤血球数変化を示す図である。

【図15】ウイルス中和抗体価を示す図である。

【図1】

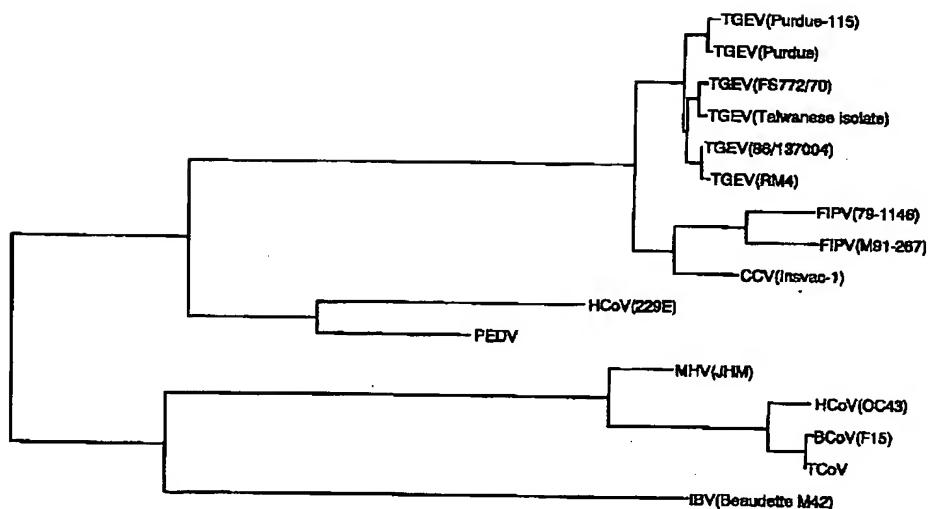


【図3】

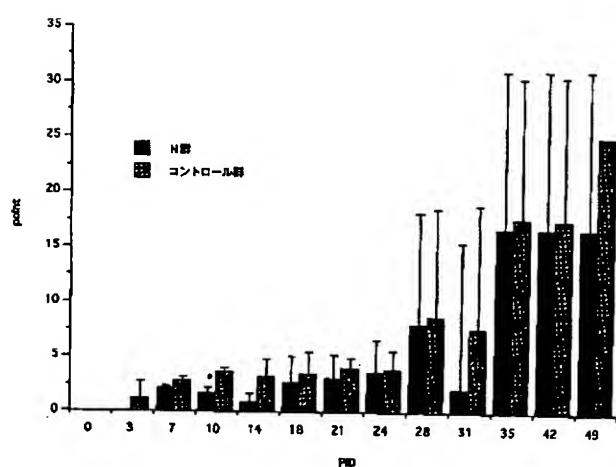


N/pCAGGSの制限酵素切断電気泳動写真
 Lane 1,2; BglII切断
 Lane 3,4; HindIII切断
 Lane 5,6; SalI & PstI切断
 Lane 7,8; MspI & PstI切断
 Lane 1,3,5,7; 正方向
 Lane 2,4,6,8; 逆方向

【図2】



【図4】



FIPV challenge後のN群の臨床スコアの変化

(*) 有意 ($p < 0.05$)

【図9】



M/pCAGGSの制限酵素切断電気泳動写真

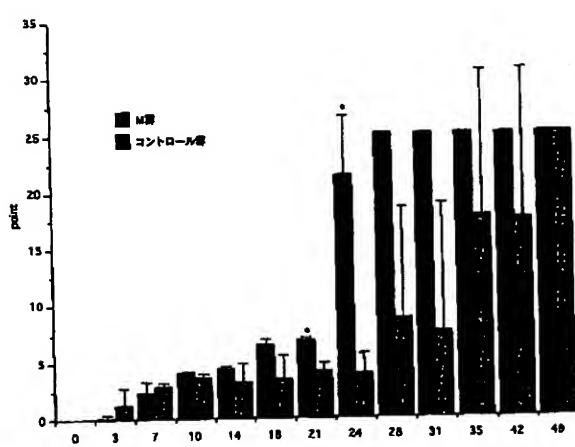
Lane 1,2; BglII切断

Lane 3,4; Nde I切断

Lane 5,6; HindIII & PvuII切断

Lane 7,8; HindIII & PvuII切断

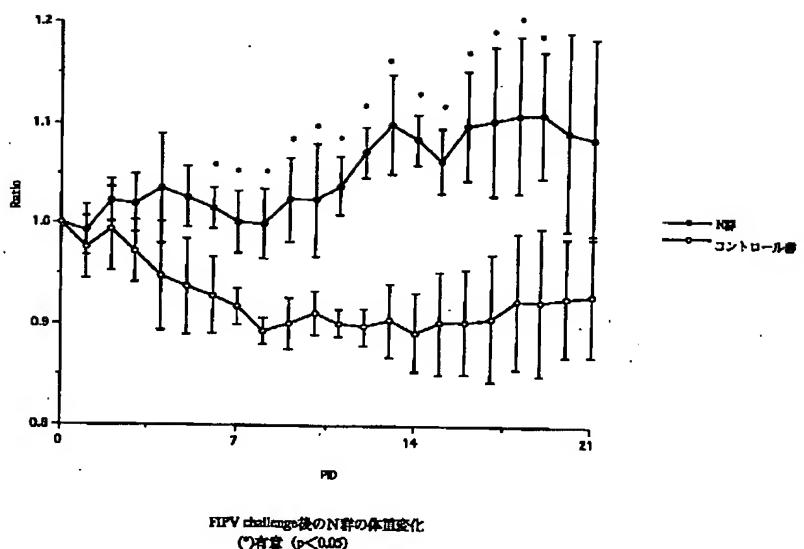
【図10】



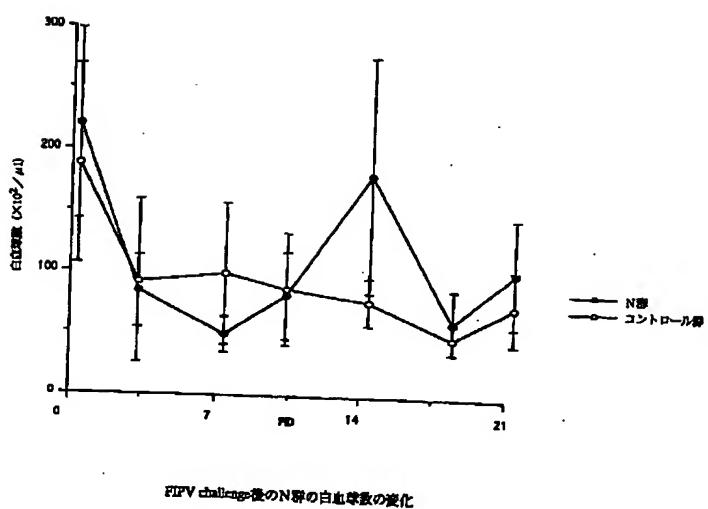
FIPV challenge後のM群の臨床症状スコアの変化

(*) 有意 ($p < 0.05$)

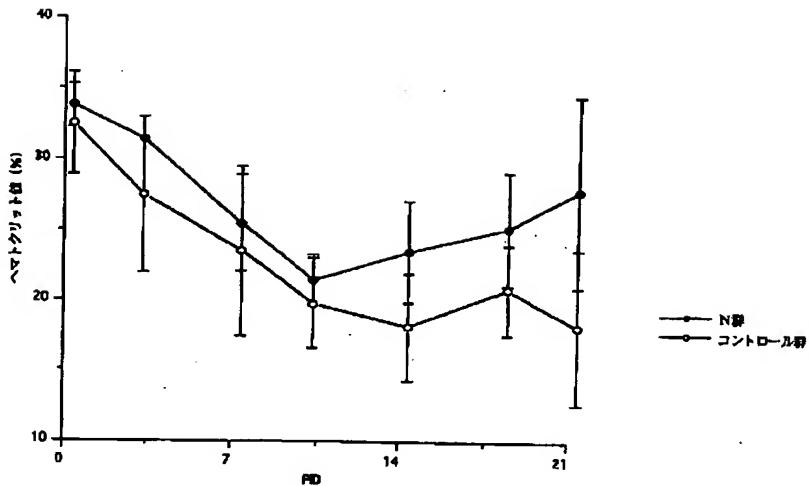
【図5】



【図6】

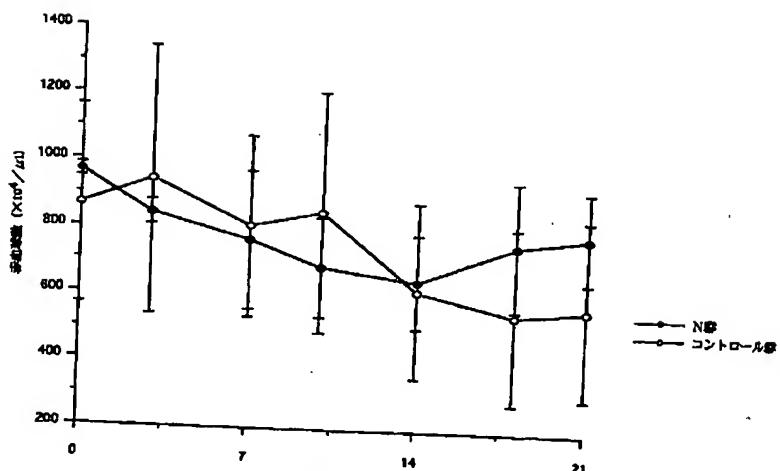


【図7】



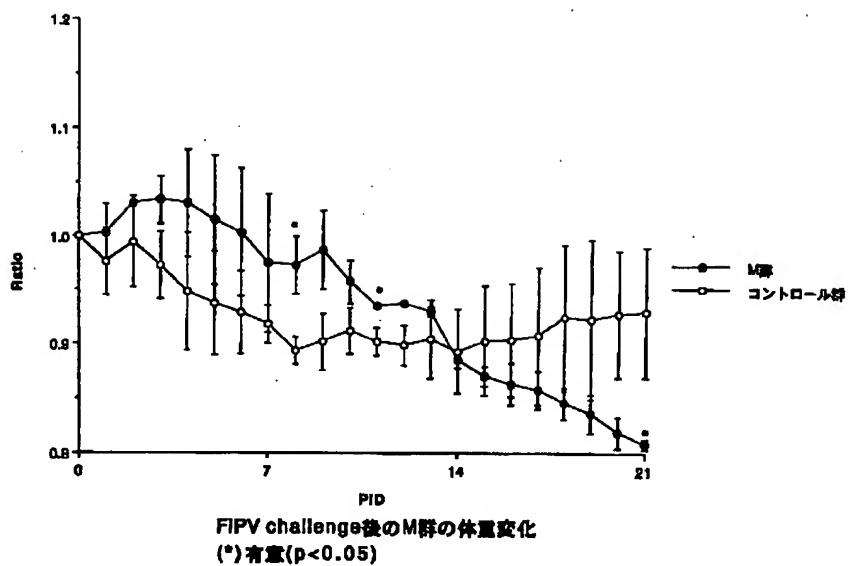
HPV challenge後のN群のヘマトクリット値の変化

【図8】

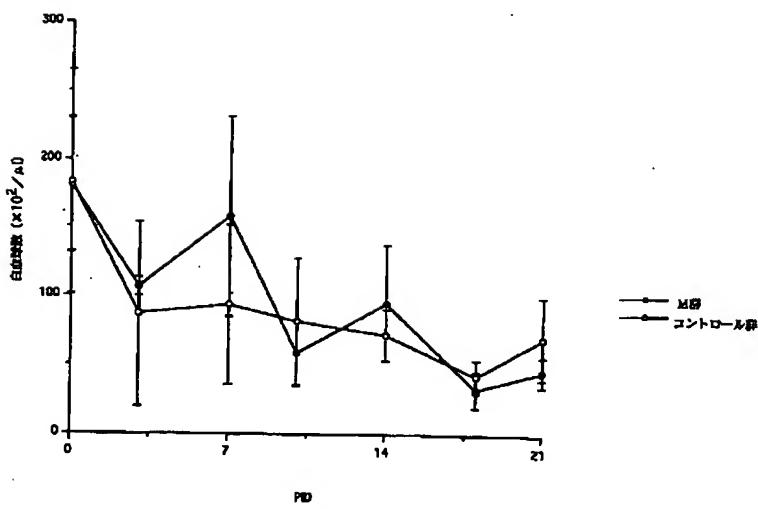


HPV challenge後のN群の赤血球数の変化

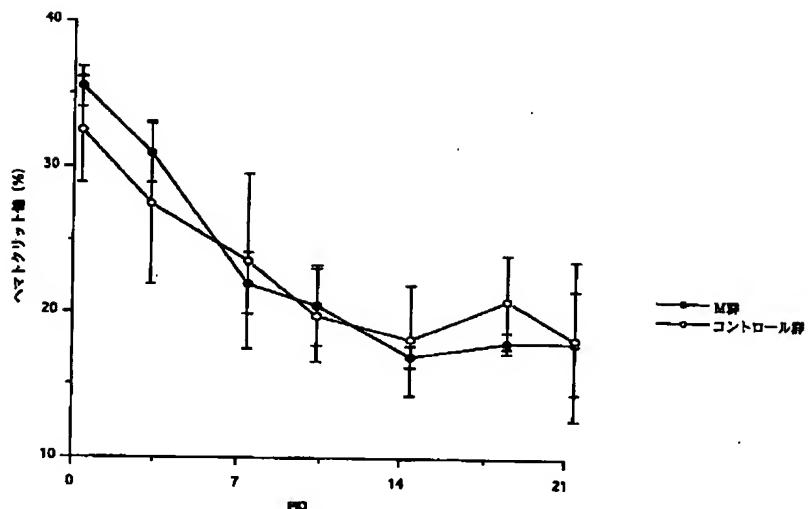
【図11】



【図12】

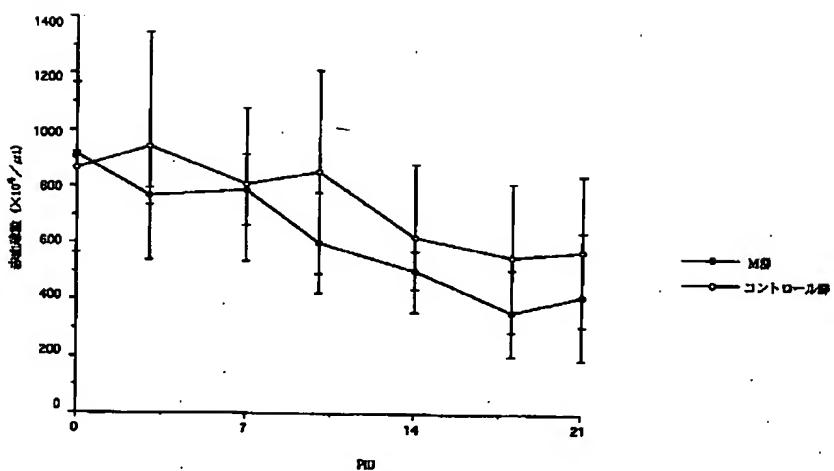


【図13】



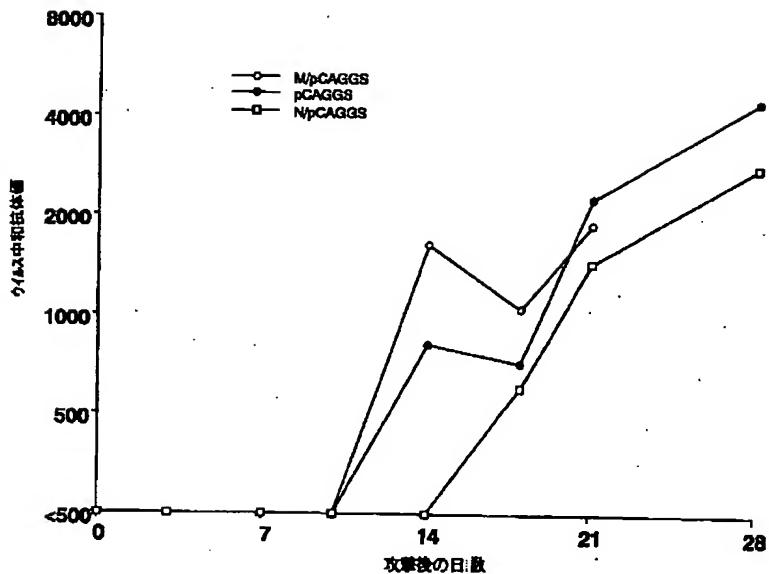
FIPV challenge後のM群のヘマトクリット値の変化

【図14】



FIPV challenge後のM群の赤血球数変化

【図15】



フロントページの続き

F ターム(参考) 4B024 AA01 AA11 BA80 CA04 CA20
DA02 EA04 FA02 GA11 GA18
HA17
4C084 AA13 NA01 ZC611 ZC612
4C085 AA03 BA71 GG03

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- BLACK BORDERS**
- IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- FADED TEXT OR DRAWING**
- BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- SKEWED/SLANTED IMAGES**
- COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- GRAY SCALE DOCUMENTS**
- LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.